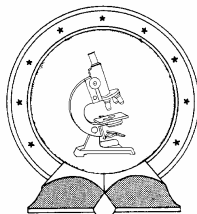


DE TTK



1949

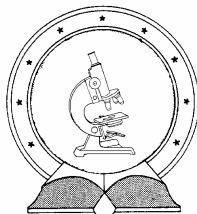
BIOLÓGIAI JELENTŐSÉGŰ VEGYÜLETEK MODERN TÖMEGSPEKTROMETRIAI VIZSGÁLATA

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Kalmár-Biri Bernadett
témavezető: Dr. Kéki Sándor

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Kémiai Doktori Iskola
Debrecen, 2014

DE TTK



1949

BIOLÓGIAI JELENTŐSÉGŰ VEGYÜLETEK MODERN TÖMEGSPEKTROMETRIAI VIZSGÁLATA

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Kalmár-Biri Bernadett
témavezető: Dr. Kéki Sándor

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Kémiai Doktori Iskola
Debrecen, 2014.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémiai Doktori Iskola K/4 Makromolekuláris és felületi kémia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2014. február 6.

Kalmár-Biri Bernadett

Tanúsítom, hogy Kalmár-Biri Bernadett doktorjelölt 2009-2012 között a fent megnevezett Doktori Iskola K/4 Makromolekuláris és felületi kémia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2014. február 6.

Dr. Kéki Sándor

BIOLÓGIAI JELENTŐSÉGŰ VEGYÜLETEK MODERN TÖMEGSPEKTROMETRIAI VIZSGÁLATA

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Kémia tudományágban

Írta: **Kalmár-Biri Bernadett** okleveles vegyész és angol-magyar szakfordító

Készült a Debreceni Egyetem Kémiai Doktori Iskolája
(Makromolekuláris és felületi kémia programja) keretében

Témavezető: **Dr. Kéki Sándor** tanszékvezető, egyetemi tanár

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Herczegh Pál tanszékvezető, egyetemi tanár (DE)

tagok: Dr. Jekő József csoportvezető, főiskolai tanár (NYF)

Dr. Posta József egyetemi tanár (DE)

A doktori szigorlat időpontja: 2012. október 25.

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2014.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kéki Sándor egyetemi tanárnak, az Alkalmazott Kémiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette és mindvégig figyelemmel kísérte a dolgozat elkészítését. Köszönöm neki a munkám során nyújtott sokrétű, önzetlen segítségét, végtelen türelmét és megértését.

Köszönetemet szeretném kifejezni *Dr. Nagy Lajosnak*, *Dr. Kuki Ákosnak* és *Dr. Deák Györgynek* szakmai és emberi támogatásukért, és a kísérletek kivitelezésében valamint az eredmények értelmezésében tett nélkülözhetetlen hozzájárulásukért. Köszönöm *Dr. Zsuga Miklós* professzor emeritusnak támogatását, hogy mindvégig figyelemmel kísérte és hasznos tanácsokkal látta el munkámat.

Szeretnék megköszönni a legösztönzőbb munkatársamnak (és férjemnek), *Dr. Kalmár Józsefnek* a türelmét és biztatását a dolgozat elkészítéséhez, valamint nem csak szakmai támogatását és tanácsait a közös munkánk során.

Szeretnék köszönetet mondani:

- *Dr. Sipos Attilának* a buprenorfin származékok szintéziséért.
- *Dr. Tőke Enikőnek* a pEtOx polimer szintézisét.
- *Dr. Mándi Attilának* a molekulaszerkezet számításokért.
- *Dr. Jan Sunner* és *Dr. Steven Foster* kutatóknak (Department of Biochemistry, University of Oklahoma, Oklahoma, USA), hogy befogadtak csoportjukba és tágíthattam tömegspektrometriai ismereteimet.
- *Tóth Georgina*, *Nagy Zsigmond Tamás* és *Szabó Zsuzsanna* diplomamunkás hallgatóknak a kísérleti munkában nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom az *Alkalmazott Kémiai Tanszék* minden tagjának a munkám során adott tanácsaikért, segítségükért és biztatásukért, valamint azért, hogy a munkám elvégzéséhez baráti légkört biztosítottak. Külön is szeretnék köszönetet mondani *Jakab Alexandrának* és *Dékány-Adamoczky Anitának*, hogy bármikor, bármilyen kéréssel fordulhattam hozzájuk.

Hálával tartozom családomnak támogatásukért.

A dolgozat elkészítését az OTKA K-101850 és a HURO/0901/058/2.2.2. számú pályázatok, valamint a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0036 számú projekt támogatta, amely az Európai Unió támogatásával és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
2. BEVEZETÉS	2
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
3.1. Lágyionizációs tömegspektrometria és alkalmazásai.....	4
3.1.1. <i>Ionforrások</i>	4
3.1.2. <i>Analizátorok</i>	6
3.2. MS/MS fragmentációs vizsgálatoknál alkalmazott fogalmak és grafikus módszerek..	7
3.3. A vizsgált vegyületek biológiai jelentősége és analitikája.....	10
3.3.1. <i>Buprenorfin</i>	10
3.3.2. <i>Szilimarin</i>	13
3.3.3. <i>Poli-(2-etil-2-oxazolin)</i>	16
4. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19
4.1. A buprenorfin MS/MS vizsgálata.....	19
4.1.1. <i>Felhasznált anyagok</i>	19
4.1.2. <i>Tömegspektrometriás és tandem MS vizsgálatok</i>	19
4.2. A szilimarin MS/MS vizsgálata.....	20
4.2.1. <i>Felhasznált anyagok</i>	20
4.2.2. <i>Folyadékkromatográfiával kapcsolt MS/MS vizsgálatok</i>	20
4.3. A poli-(2-etil-2-oxazolin) (pEtOx) MS/MS vizsgálata.....	21
4.3.1. <i>Felhasznált anyagok</i>	21
4.3.2. <i>A pEtOx polimer karakterizálása</i>	21
4.3.3. <i>Tömegspektrometriás és tandem MS vizsgálatok</i>	22
5. KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	24
5.1. A buprenorfin MS/MS vizsgálata.....	24
5.1.1. <i>Buprenorfin származékok fragmentációjának első lépései</i>	28
5.1.2. <i>A kondenzált gyűrűs alapváz fragmentációja</i>	34
5.2. A szilimarin MS/MS vizsgálata.....	46
5.2.1. <i>A fragmentáció energiafüggése</i>	47
5.2.2. <i>A szilibinek és az izoszilibinek eltérő fragmentációjának értelmezése</i> ...	55
5.2.3. <i>A fragmensionok intenzitásának energiafüggése</i>	60
5.3. A poli-(2-etil-2-oxazolin) (pEtOx) MS/MS vizsgálata.....	63
5.3.1. <i>Az előállított polimer jellemzése</i>	63
5.3.2. <i>A pEtOx polimer fragmentációja</i>	67
5.3.3. <i>A pEtOx polimer fragmentációjának energiafüggése</i>	72
5.3.4. <i>A különböző lánc hosszúságú pEtOx oligomerek fragmentációjának energiafüggése</i>	76
6. ÖSSZEFOGLALÁS	79
7. SUMMARY	81
8. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK	83
9. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	87

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	Név
APCI	léggöri nyomású kémiai ionizáció (atmospheric pressure chemical ionization)
CE	ütközési energia (collision energy)
DART	valós idejű követlen analízis (direct analysis in real time)
ESI	elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization)
LC-MS	foliadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (liquid chromatography coupled with mass spectrometry)
LC-MS/MS	foliadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria (liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry)
MALDI	mátrix segített lézer deszorpció/ionizáció (matrix assisted laser desorption/ionization)
MS	tömegspektrometria (mass spectrometry)
MS/MS	tandem tömegspektrometria (tandem mass spectrometry)
QQQ	hármass kvadрупól (triple quadrupole)
Q-TOF	kvadрупól-repülési idő analizátor (quadrupole-time of flight analyser)
TOF	repülési idő analizátor (time of flight analyser)
SY	disszociálatlan hányad (survival yield)

2. BEVEZETÉS

Kutatásaimat a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén végeztem, ahol természetben előforduló, vagy szintetikusan előállított molekulákat vizsgáltam tömegspektrometriai módszerekkel. Doktori munkám során három vegyületcsaláddal foglalkoztam, amelyek közül az elsőben a buprenorfin és előállításának közttermékei találhatóak. A második csoportba a máriatövis növényi extraktumának a szilimarinnak a komponensei, a harmadik csoportba pedig, a poli-(2-etil-2-oxazolin) élőpolimerizációval előállított polimer sorolható. Minden általam vizsgált molekula orvosi biológiai jelentőséggel bír. A buprenorfin főként fájdalomcsillapítóként használják, a szilimarint májvédő hatása miatt. A poli-(2-etil-2-oxazolin) polimer a polietilénlikolhoz hasonlóan potenciálisan gyógyszer-vivőanyagként alkalmazható.

Ezen vegyületek karakterizálásához ma már elengedhetetlen a pontos tömeg ismerete, ami tömegspektrometriával határozható meg. Lágyionizációs módszer segítségével a teljes molekula ionizálódik addukt ionok képződésével, így a tömegspektrumban megjelenő tömeg/töltés értékből közvetlenül meghatározható a semleges molekula tömege. Kellően nagy felbontású tömeganalizátor segítségével a molekulatömeg 3-5 tizedesjegy pontossággal mérhető, ezáltal a molekula összegképlete is nagy bizonyossággal megállapítható. A molekula szerkezetéről azonban a pontos tömeg még nem árul el információt, ehhez MS/MS spektrumok felvételére van szükség. A keletkezett fragmens ionok tömege és gyakorisága már elegendő információt szolgáltat a szerkezet igazolására vagy felderítésére.

Az irodalomban számos analitikai módszer található a buprenorfin mennyiségi és minőségi meghatározására, amely során folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (LC-MS), vagy tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) detektálást alkalmaznak. Más morfin származékoktól eltérően, a buprenorfin fragmentációs viselkedését részletesen még nem vizsgálták. Ezek a vizsgálatok a buprenorfin és származékai azonosítása szempontjából feltétlenül szükségesek. Feltérképeztük a keletkező fragmens ionok tömegét, és javaslatot tettünk szerkezetükre. Összehasonlítottuk a rokonvegyületeket, és meghatároztuk a közös alapszerkezetre jellemző fragmens ionokat. Azokat az ionokat is kerestük, amelyek egymástól meg tudják különböztetni a rokonvegyületeket. Ezen kívül vizsgáltuk a fragmentáció energiafüggését, ami a bomlás mechanizmusát segített feltérképezni. A fragmentáció energiafüggése megmutatja, hogy egy adott specifikus fragmens ion keletkezése milyen ütközési energia tartományban

jellemző. Egy kiválasztott ütközési energián felvett spektrumban a legintenzívebb fragmens ion egy másik ütközési energián lehet, hogy meg sem jelenik. A több energián rögzített spektrumok tömegspektrometriai adatbázisokba bekerülve segíthetik az ujji lenyomatszerű azonosítást.

A máriatövis gyógynövény extraktuma a szilimarín, ami valójában több hatóanyag keveréke. Fő komponense a szilibin és az izoszilibin, azonban összesen 11 azonos összegképletű, de különböző szerkezetű komponensét tudtunk detektálni LC-MS módszerrel. Ezek közül a nagyobb mennyiségben jelenlévő vegyületeket, az említett fő komponenseket, valamint a szilidianint és a szilikrisztint már vizsgálták MS/MS körülmények között és javaslatot tettek a keletkező fragmens ionok szerkezetére. Azonban a fragmentáció energiafüggését még nem vizsgálták. A két hasonló szerkezetű vegyület, a szilibin és az izoszilibin spektrumában található kisebb eltéréseket sikeresen értelmeztük a fragmentációs utak eltérő energiaszükséglete alapján.

A poli-2-oxazolin egy olyan új polimer, amely három kiemelkedő tulajdonsága miatt került az érdeklődés előterébe. Az előállítási technikának (élőpolimerizáció) köszönhetően a kapott termék szűk molekulatömeg eloszlású, a láncvégeken és a lánc közben is könnyen funkcionálizálható. A polimer biokompatibilis. Ennek köszönhetően potenciális felhasználási területe széleskörű, ezért pontos karakterizálása szükséges. Egy polimer jellemzésére a számatlag- vagy a tömegátlag-molekulatömeg (M_n vagy M_w) és a polidiszperzitás (M_w/M_n) mennyiségek használatosak. Általánosan használt módszer a tömegspektrometria. Ezzel a módszerrel a polimer sorozat különböző lánc hosszúságú tagjai külön-külön láthatóak, így a molekulatömeg eloszlás mellett meghatározható a polimer ismétlődő egységének és a láncvégen lévő csoportoknak a molekulatömege. A protonált poli-(2-etil-2-oxazolin) MS/MS fragmentációját korábban még nem vizsgálták, így célunk volt, hogy felderítsük a bomlási utakat, és javaslatot tegyünk a keletkező fragmens ionok szerkezetére. Összevetettük az elektroporlasztásos ionizáció (ESI), a légköri nyomású kémiai ionizáció (APCI) és a valós idejű közvetlen analízis (DART) technikákkal ütközés által kiváltott fragmentáció esetén kapott eredményeket. Emellett megállapítottuk a különböző lánc hosszúságú oligomerek fragmentációjának energiafüggését is.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Lágyionizációs tömegspektrometria és alkalmazásai

A kezdeti nagy energiájú, úgynevezett kemény ionizációs módszerek még korlátozott számú vegyület vizsgálatára voltak csak alkalmasak, és a kapott eredmények kiértékelése is nehézkes volt. A lágyionizációs technikák megjelenésével a vizsgálható vegyületek száma megsokszorozódott, és a kapott eredmények könnyebben értelmezhetővé váltak.¹ Az ionforrások mellett az analizátorok tekintetében is jelentős fejlődés történt. Az újabb analizátorokkal lehetővé vált 4-5 tizedesjegy pontossággal meghatározni a vizsgált ionok tömeg/töltés értékét, ami 100-900 m/z vegyületeknél már nagy bizonyossággal igazolja a feltételezett összegképletet.² A továbbiakban röviden bemutatom azokat az ionforrásokat és analizátorokat, amelyeket a kutatásaim során használtam.

3.1.1. Ionforrások

Mátrix segítette lézer deszorpció és ionizáció (MALDI). A MALDI volt az első lágy ionizációs módszer, vagyis a vizsgálandó molekula fragmentáció nélkül került gáz fázisba és ionizálódott. A leggyakrabban alkalmazott mintaelőkészítés során a mintát egy megfelelő mátrix anyaggal kell összekeverni. A minta-mátrix keverék a mintatartó lemezre felcsöppentve megszárad, és vákuumban egy nitrogén lézer közli vele az ionizációhoz szükséges energiát. A lézer fotonokat a mátrix anyag nyeli el, ezt követően deszorbeálódik a felületről. A vizsgálandó vegyületnek a gerjesztett állapotban lévő mátrix anyag adja át az energiát, így kíméletesen ionizálja.³ Hőérzékeny és nagy molekulatömegű (akár 10^5 - 10^6 Dalton) makromolekulák, például enzimek is fragmentáció nélkül ionizálhatóak ezzel a technikával.

Elektroporlasztásos ionizáció (ESI). Az ESI ionizáció⁴ nem vákuumban, hanem légköri nyomáson zajlik. Az oldat fázisban lévő analit egy kapillárison keresztül jut be az ionforrás porlasztójába. A porlasztó kapillárisa és a tömegspektrométer bevezető kapillárisa közötti feszültségkülönbség hatására az oldószercseppek felületén töltés halmozódik fel. Az ionforrásban egyre kisebb méretű, felületükön egyre nagyobb töltéssűrűségű cseppek keletkeznek a párolgás következtében. Az ionok kialakulása kétféle elmélet alapján értelmezhető, a

töltésvisszamaradási vagy az ionpárolgási modellel. A töltésvisszamaradási elmélet alapján az oldószer párolgása következtében a töltött csepp felületen megnő a töltéssűrűség, a töltéstaszítás hatására a csepp szétrobban, és kisebb cseppek majd ionok keletkeznek. Az ionpárolgási modell alapján a nagy töltött cseppekből kisebb, töltéssel rendelkező ionok szakadnak ki. Az ionizáció mechanizmusának köszönhetően a molekulák kisebb ionokkal adduktot képezve ionizálódnak. Az sem ritka, hogy a vizsgálandó molekula dimerként is megjelenik a spektrumban. Nagyobb molekulatömeg esetén gyakori a többszörös töltésű ionok képződése.⁵ A különböző töltésű, így különböző m/z értékű ionok egy sorozatot alkotnak a spektrumban.

Az ESI a legelterjedtebb ionizációs technika a folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás módszereknél (LC-MS). A két műszer összekapcsolásához szükség van egy splitterre, amely lecsökkenti a folyadékkromatográf kolonnájáról távozó eluensáramot az ionforrásnak megfelelő értékre. LC-MS kapcsolt módszereknél csak olyan eluensek használhatóak, amelyek MS kompatibilisek. A nem illékony pufferek, például a gyakran használt foszfát nem használható, mert visszaszorítja a vizsgálandó vegyület ionizációját.⁶

Légköri nyomású kémiai ionizáció (APCI). Légköri nyomáson zajló lágy ionizációs technika. Az oldatfázisú mintát ennél a módszernél is egy porlasztó juttatja az ionforrásba, fontos különbség azonban az ESI-től, hogy a porlasztó kapillárison nincs feszültség, vagyis a párologtatás és az ionizáció két külön lépésben történik. Az oldószeráram nagyobb hőmérsékleten kerül gázfázisba. Az ionizáció ezután történik korona feszültség rákapcsolásával. A vizsgálandó vegyület a koronafeszültség előjelétől függően protonálódik vagy deprotonálódik. Az APCI hátránya, hogy az ionforrásban alkalmazott nagy hőmérséklet miatt nem alkalmas hőérzékeny anyagok és nagy molekulatömegű anyagok vizsgálatára.

Ez az ionforrás is használható folyadékkromatográfiával kapcsolva. A nagyobb hőmérsékletű porlasztás lehetővé teszi, hogy a kolonnáról érkező eluensáram akár gyengítetlenül az ionforrásba kerüljön. Az elválasztáshoz használt eluens egyben az ionizációhoz szükséges segédoldószer szerepét is betölti.

Valós idejű közvetlen analízis (DART). Gyakorlatilag mintaelőkészítés nélküli technika, gáz, folyadék vagy szilárd halmazállapotú minták elemzéséhez.⁷ Az ionforrás nyitott, az ionizációhoz szükséges elektromos kisüléssel gerjesztett gázt szolgáltató egység a tömegspektrométer belépő nyílásával szembe helyezkedik el. Egy speciális egység a gerjesztett gázból elektrosztatikus térben

leválasztja a gázionokat, és a kilépő semleges gerjesztett gázt 200-300 °C-ra melegíti. A kilépő gázáram a levegő nedvességtartalmát ionizálja, és a keletkező ionklaszterek az áramba helyezett mintával ütközve ionizálják azt. Az ionizált analitot a gázáram szállítja a tömegspektrométer belépő nyílásához.

3.1.2. Analizátorok

Az analizátor feladata az eltérő tömeg/töltésű ionok elválasztása egymástól, statikus vagy változó elektromos és mágneses mezőben. Az analizátorok nagy vákuum alatt működnek annak érdekében, hogy az ionok mozgását ne akadályozzák ütközések. Egy adott analizátor főbb jellemzői a vizsgálható tömegtartomány, a felbontás és a tömegpontosság. Kutatásom során kéttípusú analizátorral dolgoztam a kvadrupól (Q) és a repülési idő (TOF) analizátorokkal, így a továbbiakban ezeket mutatom be részletesen.

Kvadrupól analizátor (Q). Az analizátor 4 párhuzamosan elhelyezkedő elektródból áll. Ezekre egyen- illetve nagyfrekvenciás váltófeszültség összetevőjű feszültséget kapcsolnak. Az ionforrásból egyenletes gyorsítófeszültség hatására érkező ionok a létrejövő elektrosztatikus térben méretüktől függően különböző energiát képviselő trajektóriára állnak az analizátorban. Az elektródokra kapcsolt váltó- és egyenáram nagysága határozza meg, hogy milyen méretű ionok képesek keresztül haladni az analizátoron. A nemkívánatos ionok az elektródokba ütközve elvesztik töltésüket, és a vákuummal távoznak. A kiválasztott tömegtartomány néhánytól több száz m/z értékig is terjedhet. A kvadrupólt gyakran használják más analizátorokkal összekapcsolva, például a hármas kvadrupól (QQQ) analizátor három egymáshoz kapcsolt kvadrupólból épül fel, amelyekből a középső egy ütközési cella. Nagyobb felbontás és tömegpontosság is elérhető, amennyiben a harmadik kvadrupól helyett egy repülési idő analizátor szerepel (QqTOF).

Repülési idő analizátor (TOF). Működésének elve, hogy azonos elektromos tér által gyorsított ionok tömegüktől függően eltérő idő alatt érnek el egy erőter mentes repülési cső végén található detektorhoz.⁸ Az ionok impulzusszerűen kerülnek a repülési csőbe, így az analízis nem folyamatos. Minél hosszabb a megtett út, annál nagyobb az analizátor felbontása. Átlagosan 1-1,5 m hosszú repülési csövek vannak forgalomban. A felbontás tovább növelhető a repülési cső végére beépített reflektronnal.⁹ A reflektoron használatával egyrészt

nő a megtett úthossz, másrészt az eltérő kiindulási energiájú ionok sebességét kiegyenlíti tovább növelve a felbontást. A TOF analizátor által lefedett tömegtartomány széles, több tízezres. Nagy tömegű ionok esetén a refleatron már nem hatékony, ezért a MALDI-TOF tömegspektrométerek esetében az analizátorhoz két detektor is csatlakozik. Az egyik a repülési cső végén, a másik pedig az analizátor bejárata mellett helyezkedik el. Az utóbbi refleatron módban használható. Az analizátor tömegpontossága és a felbontása is nagy: a vizsgálandó vegyület tömege 3-4 tizedesjegy pontossággal meghatározható.

3.2. MS/MS fragmentációs vizsgálatoknál alkalmazott fogalmak és grafikus módszerek

Ütközés által kiváltott fragmentáció (Collision induced dissociation: CID). Ütközés által kiváltott fragmentációról beszélünk, ha a disszociációt gázmolekulákkal való rugalmatlan ütközés váltja ki. Ütközési gázként nitrogén vagy argon használatos. Egy adott ionban a kötéshasadás több kisebb energiájú ütközés összegződéseként is bekövetkezhet. A kvadrupól ütközési cellában általában 10-50 ütközés szükséges egy kötéshasadáshoz. Az energia- és impulzusmegmaradás törvényei szerint a gázrészecskékkel történő ütközés során az ionok kinetikus energiájának csak egy része alakul át belső energiává:

$$E_{cm} = \frac{m_g}{m_i + m_g} E_{kin}$$

ahol E_{cm} , tömegközépponti energia, az a maximális energia, amely belső energiává alakulhat, m_g a gázrészecske, m_i az analiton tömege, E_{kin} pedig az analiton kezdeti mozgási energiája.

Jelen dolgozatban szereplő vegyületek CID fragmentációjának vizsgálatát 3 összekapcsolt tömeganalizátorral felszerelt készülékben (QqTOF) végeztük. Általánosan elmondható, hogy kapcsolt tömeganalizátorok esetén az első analizátor, jellemzően egy kvadrupól, választja ki a vizsgálandó prekursoriont, ami az ütközési cellába lép. Az ütközési cella is általában kvadrupól, amiben a belépő, adott energiájú prekursorion gázmolekulákkal ütközve fragmentálódik. A harmadik analizátor a fragegmenteket választja el m/z szerint. Ezzel a technikával csak egy lépésben vizsgálhatjuk egy vegyület fragmentációját, a keletkező ionok további fragmentációja már nem tanulmányozható. Amennyiben magasabb rendű

fragmensek keletkezését kívánjuk tanulmányozni az általam használt készülékkel, úgy az elsőgenerációs bomlástermékeket már az ionforrásban elő kell állítani. Ezután az elsőgenerációs fragmensek közül választjuk ki azt, amit további fragmentációnak vetünk alá. Ez a módszer a pszeudo-MS³ technika.

A folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás módszerek (LC-MS/MS) nagy előnye, hogy egyetlen analitikai elemzésből több információt kaphatunk a vizsgálandó anyagról. Ezen információk, például a retenciós idő önmagában nem lehetne elegendő ahhoz, hogy egyértelműen azonosítsunk egy vegyületet, hiszen koeluálódhat bármilyen vegyülettel, amelynek hasonló a polaritása és a visszatartása az adott kromatográfiás rendszerben. Önmagában, a tömegspektrumból kiolvasható tömeg/töltés érték sem írhat le egyértelműen egy molekulát. Abból az izotóp csúcsok távolságát megvizsgálva megállapíthatjuk az ion töltését, ennek ismeretében az ion tömegét. Ha elegendő felbontású és tömegpontosságú tömegspektrométerrel mértünk, akkor az ion pontos tömegéből matematikai számolással javaslatot tehetünk egy feltételezett összegképletre, azonban az ehhez tartozó szerkezeti képletről, az atomok kapcsolódási sorrendjéről nem kapunk információt. Ha azonban LC-MS/MS technikát használunk a retenciós időn és a molekulatömegben vagy összegképletben túl egy jellemző fragmens ion is segít a molekula azonosításában. Ez a technika nagy érzékenységgű mennyiségi meghatározásra is alkalmas.

Disszociálatlan hányad (survival yield: SY). A fragmentáció mértékét kvantitatívan leíró mennyiség a disszociálatlan hányad, amely jellemzi az MS/MS spektrumban a prekursorion és a fragmensionok arányát.^{10,11,12} A disszociálatlan hányad a következő egyszerű egyenlettel definiálható:

$$SY = \frac{I_p}{I_p + \sum I_f}$$

ahol I_p a prekursorion intenzitása, $\sum I_f$ az összes fragmension intenzitásának az összege. A SY értéke a definícióból adódóan 0 és 1 közé esik. A SY az alkalmazott ütközési energiával változik. Minél nagyobb energiával történik a fragmentáció, annál több fragmension jelenik meg, és annál kisebb a prekursorion intenzitása az MS/MS spektrumban. Az ütközési energia függvényében ábrázolt SY értékek egy csökkenő szigmoid alakú görbére illeszkednek. A görbe jellegzetes pontja az SY=0,5 értékhez tartozó ütközési energia (CE_{50}), másképpen az 50%-os fragmentáltsághoz szükséges energia értéke. Az SY görbéből a CE_{50}

értéke kétpontos lineáris interpolációval határozható meg.¹³ Ezt az energiaértéket karakterisztikus ütközési energiának is nevezik.

Letörési görbe (breakdown curve). Egy adott fragmension intenzitásának változását mutatja az ütközési energia függvényében. A letörési görbe általában haranggörbe alakú, hiszen adott fragmension kis energiánál még nem keletkezik, nagyobb ütközési energiánál megjelenik, az ütközési energiával együtt nő az intenzitása, majd elegendően nagy energia esetén már tovább bomlik kisebb fragmensionokká. A görbe kiinduló pontján kívül, amit megjelenési energiának nevezünk, a maximuma is jellegzetes pont. A maximum intenzitáshoz tartozó energiaérték megmutatja, hogy mely fragmensionok keletkezéséhez szükséges nagyobb energia, valamint konszekutív bomlási reakciók sorrendjéről is információt szolgáltat.

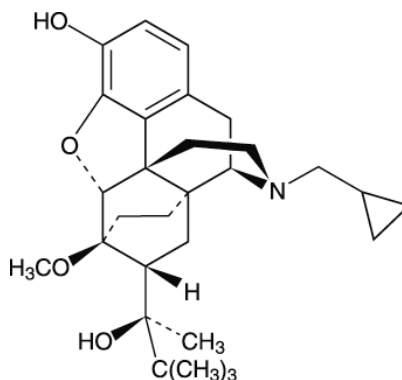
3.3. A vizsgált vegyületek biológiai jelentősége és analitikája

3.3.1. Buprenorfin

Az ópiumot, a mákból kinyerhető összetett gyűrűs szerkezetű, N-tartalmú vegyületeket tartalmazó extraktumot már az ókorban ismerték és használták elsősorban álmatlanság ellen és fájdalom csillapítására. Az ópium főbb alkaloidjai a morfin, a kodein, a papaverin, a tebain és az oxikodon. Ezek az opiátok csökkentik a fizikai érzékenységet és az ingerekre való válaszkészséget, így fájdalomcsillapításra, menstruációs görcsök kezelésére és köhögéscsillapításra használhatóak. Előnyös hatásai mellett azonban opiátok használatakor számos mellékhatás is felléphet: zavartság, hallucináció, szédülés, fejfájás, delírium, vizelet-visszatartási gondok, izommerevség. Alkalmazásukat tovább korlátozza, hogy függőséget okoznak.¹⁴

Az első félszintetikus opiátokat Bentley és munkatársai állították elő. Céljuk olyan fájdalomcsillapító hatású vegyület előállítása volt, amely függőséget nem okoz. Munkásságuk során számtalan származékot szintetizáltak a természetes opiátokból, főként a tebainból kiindulva Diels-Alder addícióval.^{15,16,17,18} Ezen vegyületeket gyűjtőnéven tevinoloknak nevezik. Legismertebb tagjai az opiát agonista etorfin^{19,20}, az antagonistá diprenorfin^{21,22} és a buprenorfin.²³

A buprenorfin egy félszintetikus tebain származék (1. ábra), amelynek a 7-es szénatomon egy tercier-butil csoportot tartalmazó oldallánca van. A tercier-butil csoport a molekula lipofil jellegét erősíti, így befolyásolva a szervezetben való felszívódását.



1. ábra A buprenorfin-naloxon gyógyszer és a buprenorfin szerkezeti képlete.

A buprenorfin a μ -opiát receptoron részleges agonista. Lassabban eliminálódik a receptorról, mint a morfin, így hatása hosszabb ideig tart. A κ -receptoron antagonist. Ami talán a legfontosabb, hogy kevésbé okoz függőséget.²⁴ Ezen farmakológiai tulajdonságai teszik lehetővé gyógyszerként történő felhasználását.^{25,26}

Kis dózisban akut és krónikus fájdalom csillapítására használják. Mint korábban már említettük, kevésbé okoz függőséget, mint a hagyományosan erre a célra használt opiátok, például a morfin. Nyelv alatt ható tablettaként 0,2 mg-os hatáserősséggel Temgesic[®], injekcióként 0,3 mg/ml hatáserősséggel Bupren[®] néven forgalmazzák. Később nagyobb dózisban, 2 mg és 8 mg-os hatáserősségű nyelv alatt ható tablettaként az opiát függőség kezelésére alkalmazható gyógyszerként hozták forgalomba Subutex[®] néven. A Suboxone[®] a buprenorfin mellett 1:4 arányban naltrexon hatóanyagot is tartalmaz.^{27,28} A Suboxone nemcsak nyelv alatt ható tablettaként, hanem nyelv alatt ható filmként is kapható. Utóbbi gyógyszerforma előnye, hogy a film jól illeszkedik a nyelv alá és nincs veszélye annak, hogy a beteg lenyeli.

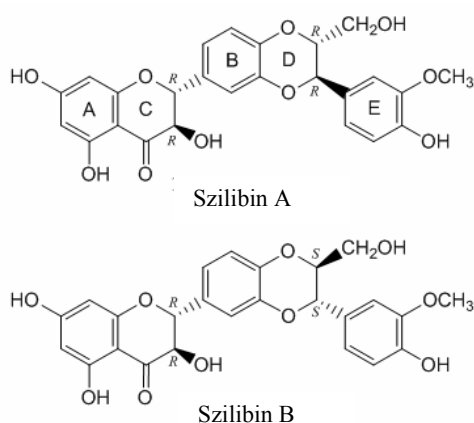
A buprenorfin ezen felhasználásai miatt rendkívül fontos a vegyület fizika és kémiai tulajdonságainak ismerete és az alapos analitikai vizsgálata. Számos kromatográfiás módszert fejlesztettek és validáltak ennek a hatóanyagnak a minőségi és mennyiségi meghatározására, amelyek sok esetben tömegspektrometriás detektálást használnak.^{29,30} Az egyszerű MS detektorok mellett még inkább elterjedt a folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem MS/MS használata, amely segítségével a buprenorfin és metabolitjai párhuzamosan is meghatározhatóak.^{31,32,33} Olyan analitikai módszereket is kifejlesztettek, amelyek segítségével több opiát származék egyidejű vizsgálata,³⁴ illetve több gyógyszer hatóanyag párhuzamos analízise is elvégezhető.^{35,36,37} A legtöbb esetben ESI ionforrást használnak.^{31,32,33,34,35} Gergov és munkatársai kidolgoztak egy olyan LC-MS/MS módszert, amely megfelelő mintaelőkészítés után vérmintából 238 hatóanyag, köztük a buprenorfin kvalitatív azonosítására alkalmas.³⁵ Három adatot használnak fel: a retenció időt, a protonált molekula és egy jellegzetes fragmens ion tömeg/töltés értékét.

Annak ellenére, hogy számos módszer használja fel a jellemző fragmens ionokat az azonosításhoz, a buprenorfin MS/MS fragmentációját részletesen még nem vizsgálták. Kutatásaink során ezt a hiányt szerettük volna pótolni a buprenorfin és négy, ahhoz szerkezetileg nagyon hasonló vegyület fragmentációs tulajdonságainak vizsgálatával. A buprenorfin származékokból ESI körülmények között képződő protonált ionok fragmentációját Q-TOF tömegspektrométerrel

vizsgáltam. A kis, közepes és nagy energiával felvett MS/MS spektrumok felhasználhatóak ujjlenyomatszerű azonosításnál,^{38,39} és alapját képezhetik a jellemző fragmens ion kiválasztásának LC-MS/MS módszereknél. Összehasonlítjuk az eltérően szubsztituált alapvázak fragmentációs stabilitását is, és feltérképezzük a teljes fragmentációs útvonalat. Fontos megjegyezni, hogy az értekezésben tárgyalt fragmens ionok közül nem mindegyiknek van analitikai szerepe a viszonylag kis intenzitásuk miatt, de teljessé és érthetővé teszik az általános fragmentációs sémát. Az analitikai felhasználás szempontjából jelentős fragmens ionokat az ábrákon és a szövegben is ki fogom hangsúlyozni. A fragmentációs útvonalak felépítéséhez pszeudo MS³ méréseket^{40,41} végeztem, valamint a fragmens ionok megjelenési energiájából,^{42,43} vagyis a fragmentáció energiaszintjéből vontam le következtetéseket. A javasolt fragmentációs mechanizmust a korábban már publikált morfin származékok, a morfin,^{44,45,46,47} a kodein,^{44,45,46,47} a tebain^{44,45,46} és a papaverin^{46,48} fragmentációjával összehasonlítva mutatom be.

3.3.2. Szilimarín

A máriatövis (*Silybum marianum*) évszázadok óta használt gyógynövény. Magjából nyerhető ki a hatóanyagok keveréke, a szilimarín, amely kedvező farmakológiai hatással bír.^{49,50,51,52,53} A máriatövis magja 3-4%-ban tartalmaz szilimarint. A szilimarín mellett 20-35%-ban találhatóak zsírsavak, köztük a linolin sav. A szilimarint főként májbetegségek kezelésében használják májvédő és májregeneráló hatása miatt.^{54,55,56,57} Az alkalmazott hatáserősség nagyon eltérő lehet, 400-1200 mg között változik a napi ajánlott dózis. Gyógyhatását az elmúlt években több ezer publikáció tárgyalta, évente több mint 1500 cikk jelenik meg a szilimarínról, illetve komponenseiről.



2. ábra A máriatövis virága és a szilimarín két fő komponensének a szerkezeti képlete.

A szilimarint használják különféle mérgezések kezelésénél, legyen az mérges gomba, kígyóméreg, más természetes, vagy szintetikus toxin illetve alkohol.⁵⁸ Májvédő hatása annak köszönhető, hogy erősíti a májsejtmembránokat, ártalmatlanítja a májba jutó toxinokat így védi a májat a károsodástól, illetve elhalástól. Nemcsak védi a májsejteket a további pusztulástól, hanem elősegíti a károsodott sejtek regenerálódását és fokozza a májsejtek osztódását, termelődését. Ennek megfelelően különböző eredetű májkárosodások, májsugor és krónikus hepatitis kezelésénél is használják.^{59,60,61,62,63}

A szilimarín, illetve egyes komponenseinek rákellenes hatását is kutatják, de kemoprotektív hatása sokkal fontosabb. Ugyanis a kemoterápiák során használt rákellenes szerek mindegyike mérgezi a májat rövid- vagy hosszútávon, ezzel komoly mellékhatásokat okozva. Ezen gyógyszereknek azonban jelenleg nincs biztonságos alternatívája, így a betegek a mellékhatásokat kénytelenek elszenvedni. A szilimarín hasznos kiegészítője lehet a kemoterápián áteső betegek kezelésének, hiszen segítségével megelőzhető vagy kezelhető a rákellenes terápia következtében kialakuló májbetegség.^{64,65} A szilimarín komponensek antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonsággal is rendelkeznek. Az eddig említett felhasználások mellett a tüdő, a vese, a hasnyálmirigy és a prosztatata megbetegedések kezelésében is jótékony hatással bír.⁶⁶ Ezenkívül klinikai vizsgálatok igazolják hatékonyságát a II típusú cukorbetegség kezelésében is.⁶⁷ A klinikai vizsgálatok nagytöbbsége a szilimarín keverék hatását vizsgálja, így a számtalan kedvező hatást nem lehet 1-1 kémiaiilag tiszta vegyülethez rendelni.⁶⁸

A szilimarín összetevői közül annak fő komponensét a szilibint izolálták először (2. ábra),⁶⁹ majd az izoszilibint, a szilidianint és a szilikrisztint.⁷⁰ 2003-ban 7 fő komponenszt tudtak izolálni: a szilidianint, a szilibin A és szilibin B, az izoszilibin A és izoszilibin B valamint a szilikrisztin A és szilikrisztin B diasztereomereket.^{71,72} Ezen diasztereomerek teljes szerkezetvizsgálatát és sztereokémiai jellemzését Lee és munkatársai végezték el röntgenkrisztallográfia, optikai forgatóképesség mérés, valamint összetett szén- és proton-NMR mérések segítségével.⁵⁰

A szilimarín keverék komponenseinek minőségi és mennyiségi analitikájához leggyakrabban folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrométert használnak elektroporlasztásos (ESI) lágyionizációs technikával.⁷³ Az összetevők gyors kromatográfiájára Wang és munkatársai dolgoztak ki UPLC-ESI-MS módszert.⁷⁴ A szilibin A és B, az izoszilibin A és B, a szilikrisztin A és B valamint a szilidianin MS/MS fragmentációját több körülmény között is vizsgálták.^{75,76} Shibano és munkatársai az ütközés által kiváltott fragmentációt hibrid ioncsapdás és repülési idő analízátorral felszerelt tömegspektrométerrel, MS/MS és MS³ technikákkal vizsgálta.⁷⁷ Kutatócsoportunk korábban a légköri nyomású kémiai ionizációval keletkező protonált szilibin fragmentációs viselkedését vizsgálta kvadrupól és repülési idő analízátorokkal felszerelt tömegspektrométerrel.⁷⁸

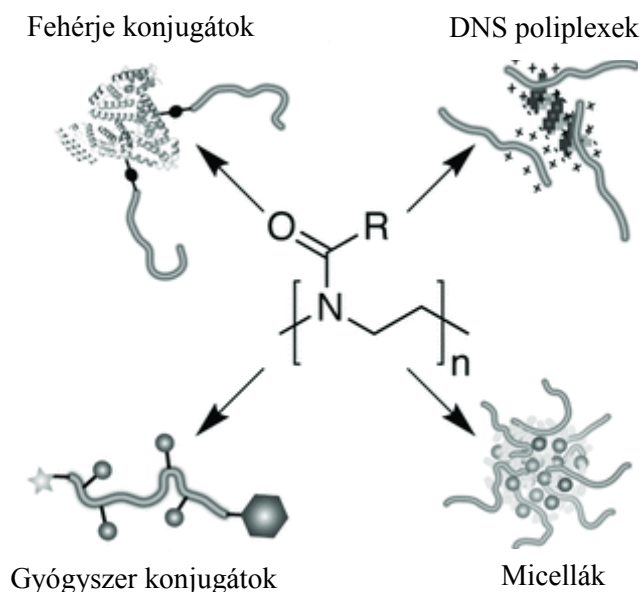
A szilimarín legtöbb főkomponense olyan rokonvegyület, amelyek csak szerkezeti képletükben különböznek, és összegképletük megegyezik. Mivel megegyezik a komponensek molekulatömege is, ezért az elválasztástechnikát

követő tömegspektrometriai detektálás nem elegendő ahhoz, hogy ezeket a vegyületeket meg lehessen különböztetni a keverékben. MS/MS fragmentációs tulajdonságaik azonban már eltérhetnek. Ezek a vegyületek szerkezetileg azonban olyan kis mértékben különböznek egymástól, hogy még a megjelenő fragmensek tömege is azonos, de a keletkező fragmensek intenzitása illetve intenzitásaránya már kissé eltér. Kutatócsoportunk korábban publikált egy olyan LC-MS kromatográfiás módszert, amellyel a szilimarin 11 azonos molekulatömegű aktív komponensét tudtuk elválasztani egymástól.⁷⁹ A már említett publikációban meghatároztunk az MS/MS méréseken alapuló kritériumokat, amelyek segítségével megkülönböztethetők a fő komponensek.

Annak ellenére, hogy a szilimarin keverék vizsgálatához elengedhetetlen az MS/MS detektálás, a komponensek fragmentációs viselkedésének ütközési energia függését korábban még nem tárgyalták. Kutatásaink során a szilimarin keverékben megtalálható 7 fő komponens fragmentációját vizsgáltuk különböző ütközési energiával. Mivel csak a keverék ált rendelkezésünkre, ezért ennek vizsgálatához folyadékkromatográfiával kapcsolt MS/MS kísérleteket végeztünk. Igazoltuk a korábban már publikált fragmens ionok szerkezeteit, illetve a nagyobb tömegpontosságnak köszönhetően helyesbítettünk a korábban javasolt szerkezetet. Továbbá magyarázatot kerestünk arra, hogy két egymáshoz nagyon hasonló szerkezetű komponens a szilibin A és az izoszilibin A fragmentációjában miért láthatóak eltérések.

3.3.3. Poli-(2-etil-2-oxazolin)

A szintetikus polimerek egy újabb csoportját képezik a poli-2-oxazolinok. Ezen vegyületeket a 60-as évek kezdete óta állítják elő, szintézisükhöz kationos, élő polimerizációt használnak, amelynek számos előnye van a későbbi felhasználások tekintetében. A szintézis jól irányítható, a termék szerkezete és ezzel a fizikai-kémiai tulajdonságai is jól tervezhetőek. Az ilyen mechanizmussal előállított polimer jól definiált, szűk molekulatömeg eloszlású. A poli-2-oxazolin könnyen funkcionálizálható a polimer lánc mindkét végén és a láncban is. Ennek megfelelően több származékát is előállították már, melyek felhasználási köre széleskörű. Legjelentősebb orvos-biológiai felhasználásuk abból ered, hogy ezek a polimerek nagyon jó biokompatibilitással rendelkeznek. In vitro és in vivo vizsgálatok azt mutatják, hogy az élő szervezetben épp olyan inerteek, mint a közismert polietilén-oxidok.^{80,81,82} A biokompatibilitásának és az inertségének köszönhetően ez a polimer minden szempontból alkalmas lehet gyógyszerek segédanyagaként történő felhasználásra (3. ábra).^{81,83,84,85,86,87}



3. ábra A poli-2-oxazolinok főbb felhasználási területei (Luxenhofer a témában megjelent cikkéből⁸⁸).

A Macromolecular Rapid Communications tudományos folyóirat 2012. októberi különszáma a poli-2-oxazolinokkal és származékaikkal foglalkozik.⁸⁹ Ez a polimer család a potenciális orvosi felhasználások miatt került előtérbe. Egyik képviselőjét a poli-(2-etil-2-oxazolin)-t már az FDA amerikai hatóság engedélyezte élelmiszer és gyógyszer adalékanyagként. Luxenhofer és munkatársai a poli-2-oxazolinok 4 felhasználási területét mutatják be.⁸⁸ A poli-2-oxazolin fehérje-konjugátok, a polimer-DNS komplexek, a gyógyszer konjugátok és a micelláris gyógyszerhordozók tulajdonságait gyűjtötték össze (3. ábra).

A polimer-fehérje konjugátok előnye, hogy a különleges katalitikus illetve funkcionális hatású fehérjéket és enzimeket szerkezetileg ellenállóbbá tegyék szintetikus makromolekulák hozzákapcsolásával. A polimer fizikai-kémiai sajátosságait átörökíti a fehérjére, így módosítva az eloszlását az élő szervezetben és az oldhatóságát. A konjugáció növeli a molekulatömeget, így nő a plazmafelezési idő. Csökkenti az emésztés okozta degradációt. A fontos biológiai funkciókat megvédheti vagy módosíthatja a végső szerkezet függvényében.

A génterápiában fontos szerepet betöltő poliplexek⁹⁰ a DNS bejuttatását segítik a célsejtekbe. Erre a célra a lineáris poli-etilén-imin polimert használják, amely a poli-(2-etil-2-oxazolin) polimerből állítható elő savas hidrolízissel. Például a HIV vírus által okozott AIDS betegség kezelésére fejlesztenek lineáris poli-etilén-imint tartalmazó gyógyszert. Az immunreakciót kiváltó plazmid DNS a polimerrel nanorészecskéket alkot, amelyek szerkezete befolyásolhatja a DNS stabilitását és a bejutását a kezelendő területre. A vegyület gyógyászati hatékonyságának ellenőrzése már a klinikai vizsgálatok fázisában tart.⁹¹

Zalipsky és munkatársai megállapították a poli-2-oxazolin-liposzóma konjugátok biokompatibilitását. Vizsgálták a vegyület mozgását, eloszlását és kiürülését az élő szervezetből.^{92,93,94} A poli-(2-etil-2-oxazolin)-t továbbá hidrogélekhez^{95,96} és termoreszponzív anyagok előállításánál⁹⁷ is használják. Kísérletek bizonyítják, hogy a radioaktív izotópokkal megjelölt poli-(2-alkil-2-oxazolin)-ok gyorsan kiürülnek a véráramból. Ezen tulajdonságok alapján alkalmasak lehetnek gyógyszer-vivőanyagként radionuklid kezelésekben.⁹⁸ Az élőpolimerizációs technikának köszönhetően a poli-2-oxazolinokból könnyen állíthatunk elő kopolimereket, főként blokk-kopolimereket.^{99,100} Ezek a blokk-kopolimerek amfifilikus molekulák, amelyek micellákat alkothatnak.^{101,102,103}

A számtalan jó tulajdonságának köszönhetően a poli-(2-etil-2-oxazolin) (pEtOx) gyógyszeripari felhasználása egyre szélesebb körű,¹⁰⁴ ezért szükségessé vált megbízható analitikai módszerek fejlesztése a polimer jellemzésére. A polimer molekulatömege és polidiszperzitása meghatározható méretkizárásos

kromatográfia segítségével, a szerkezetéről pedig a NMR mérések adhatnak információt. A polimerek jellemzésére általánosan elfogadott módszer a különböző lágyionizációs technikával felszerelt tömegspektrometria, amely segítségével az ismétlődő egység tömege és a végcsoportok is meghatározhatóak. Ezek az ionforrások lehetnek a MALDI,¹⁰⁵ az ESI és az APCI,¹⁰⁶ ugyanis ezekkel a technikákkal az oligomerek fragmentáció nélkül ionizálódnak. Az MS/MS spektrumok segítségével a polimer lánc szerkezetéről is információt kapunk.

Schubert és munkatársai a poli-(2-etil-2-oxazolin) oligomerekből MALDI¹⁰⁷ és ESI^{108,109} körülmények között nátrium ionnal képződő egyszeresen pozitív töltésű ionok fragmentációs viselkedését vizsgálták. A protonált poli-(2-etil-2-oxazolin) MS/MS fragmentációját azonban korábban még nem publikálták. Kutatásaink során a szintetizált polimer jellemzését követően részletesen vizsgáltuk az ESI, APCI és DART ionizációs körülmények között képződő protonált oligomerek ütközés által kiváltott disszociációját. Az MS és MS/MS spektrumok felvétele mellett, pszeudo MS³ méréseket is végeztünk. Meghatároztuk az egyes oligomerekhez tartozó disszociálatlan hányad ütközési energia függését. A kapott eredményeket a fragmensionok letörési görbéi alapján értelmeztük, és javaslatot tettünk a keletkező fragmension sorozatok szerkezetére és képződésük mechanizmusára.

4. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A buprenorfin MS/MS vizsgálata

4.1.1. Felhasznált anyagok

Az analitikai módszereknél alkalmazott oldószerek HPLC tisztaságúak voltak. A felhasznált vizet Millipore Direct-Q rendszerrel tisztítottuk.

A buprenorfin szintézise a tebain természetes opiát alkaloidból indul, amelyre Diels-Alder reakcióval egy metil-vinil ketont addicionálható.^{15,16,17,18} A kapott tevinon C(18)-C(19) közötti kettős kötése katalitikus hidrogénezési reakcióval telítődik, majd Grignard-Barbier reakcióval kialakíthatóak a tercier alkoholok, az úgynevezett tevinolok. A szintézis további lépései a köztitermékek N-szubsztitúciója és a 3-as szénatomhoz kapcsolódó oxigén demetilézése, mely során a kívánt farmakológiailag fontos buprenorfinhoz jutottunk.¹¹⁰

4.1.2. Tömegspektrometriás és tandem MS vizsgálatok

A fragmentációs vizsgálatokhoz Bruker microTOFQ tömegspektrométert használtunk, amely Q-TOF (quadrupole-time of flight) analizátorokkal volt felszerelve (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). A tömegspektrométer ionforrása cserélhető, a buprenorfin származékok vizsgálatakor elektroporlasztásos (ESI) ionforrást használtunk. A tömegspektrumot nátrium-trifluoracetát (NaTFA) oldattal kalibráltuk, amelyből ESI körülmények között $[(\text{NaTFA})_n + \text{Na}]^+$ ionklaszterek képződnek. A kalibrált tömegtartomány 150-1500 m/z közötti. A spektrumokat digitalizálással rögzítettük 2 GHz frekvenciával. A kapott tömegspektrumok kiértékeléséhez a Bruker DataAnalysis 3.4 szoftverét használtuk.

Elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS). A tiszta vegyületeket tartalmazó mintákból 25 μM koncentrációjú oldatokat készítettünk, amelyeket közvetlenül jutattunk az ESI ionforrásba 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ áramlási sebességgel egy fecskendőpumpával (Cole-Palmer Ins. Co.). A porlasztógáz nyomása 0,3 bar volt. A nitrogén szárítógáz hőmérsékletét 160 °C-ra állítottuk és 4000 V feszültséggel történt az ionizáció. A mérést pozitív ionmódban végeztük. Ütközési gázként nitrogént használtunk, az ütközési energiát 10 és 80 eV között változtattuk. Minden vizsgált ütközési energiával 20-60 s időtartamon rögzítettük a spektrumokat. A prekursorion kiválasztásánál alkalmazott tömegablakot 4 m/z-

re állítottuk. A pszeudo MS³ méréseknél az ionforrásban lejátszódó fragmentációhoz 90-140 eV energiát alkalmaztunk.

4.2. A szilimarín MS/MS vizsgálata

4.2.1. Felhasznált anyagok

Az analitikai módszereknél alkalmazott oldószerek HPLC tisztaságúak voltak. A felhasznált vizet Millipore Direct-Q rendszerrel tisztítottuk.

A szilimarint a máriatövis extrakciójával nyertük ki a 111-es hivatkozás szerint. A máriatövis Arad környékén gyűjtötték össze 2010-ben. Az 1200 g elporított szárított magot homogenizálást követően Soxhlet extraktorban 6 óráig hexánnal extraháltuk. Szárítást követően 6 óráig acetonitrillel maceráltuk, majd az oldószer elpárologtatása után kapott nyers szilimarint diklór-metánnal mostuk. A kapott szilimarín mennyisége 40 g, ami 3,3 tömeg%-a kiindulási máriatövis magnak. Az analitikai elemzéshez 1 mg szilimarint 1 ml metanolban oldottunk fel.

4.2.2. Folyadékkromatográfiával kapcsolt MS/MS vizsgálatok

Folyadékkromatográfiával kapcsolt elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (LC-ESI-MS). A szilimarín keverék több azonos molekulatömegű vegyületet tartalmaz, ezért a komponensek fragmentációját kapcsolt LC-MS/MS módszerrel vizsgáltuk meg. A folyadékkromatográfiás elválasztást Waters Symmetry C18 kolonnán (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) diódasoros detektorral felszerelt Waters 2695 készüléken végeztük. A mintatér hőmérsékletét 5 °C-ra, a kolonnatér hőmérsékletét 40 °C-ra állítottuk. A kromatogramot 225 és 288 nm-en vettük fel. Az alkalmazott gradiens módszert a kutatócsoportunk korábban publikálta.⁷⁹ Az LC elválasztáskor alkalmazott áramlási sebesség 1 ml/min volt, a kolonnáról lejöő áramot egy splitteren keresztül vezettük az ESI ionforrásba 1:10 split arányt használva. Az LC rendszerhez a már említett Q-TOF tömegspektrométert kapcsoltuk.

A porlasztógáz nyomása 0.3 bar és a nitrogén szárítógáz hőmérséklete 180 °C volt. Az elektroporlasztás 4000 V feszültséggel történt. A mérést negatív ionmódban végeztük. Ütközési gázként nitrogént használtunk, az ütközési energiát 5 és 32 eV között változtattuk. Minden ütközési energián felvett MS/MS

spektrumot egy 90 perces kromatográfiás elválasztást követően rögzítettünk. A prekursorion kiválasztásánál alkalmazott tömegablakot 4 m/z-re állítottuk.

4.3. A poli-(2-etil-2-oxazolin) (pEtOx) MS/MS vizsgálata

4.3.1. Felhasznált anyagok

Az analitikai módszereknél alkalmazott oldószerek HPLC tisztaságúak voltak. A felhasznált vizet Millipore Direct-Q rendszerrel tisztítottuk.

A poli-(2-etil-2-oxazolin) élő kationos polimerizációval állítható elő. 2-etil-2-oxazolin monomert (0,1 mol) és nitrobenzol-szulfonsav-metil-észter iniciátort (0,005 mol) 20 ml vízmentes acetonitrilben oldottuk, és argon alatt refluxáltattuk. A monomer:iniciátor arány 20:1 volt. A reakciót vékonyréteg kromatográfiával követtük, a mintákat etil-acetát:hexán=1:1 elegyben futtattuk és I₂-dal hívtuk elő. A reakció 48 óra alatt játszódott le. A meleg polimer oldatot 10 ml acetonitrillel hígítottuk, és 2,5 ml vizet csepegtettünk hozzá a polimer láncok lezárásához. Hozzáadtunk 1 g Na₂CO₃, és egy további óráig 70-75 °C-on kevertettük. Hűtés és szűrés után bepároltuk. A száraz bepárlási maradékot 20 ml metanolba visszaoldottuk, és 200 ml jéghideg dietil-éterbe kicsaptuk. A fehér csapadékot dekantáltuk, és újra metanolban oldottuk. A tisztítási lépést még kétszer megismételtük, és a szilárd terméket exikátorban szárítottuk.

4.3.2. A pEtOx polimer karakterizálása

Méretkizárásos kromatográfia (SEC). A kromatogramot 4 gélkolonnával felszerelt Waters készülékkel vettük fel. A kolonnák paraméterei: Styragel 4,6 x 300 mm, 5 µm HR 0,5, 1, 2 és 4. A készülék Waters Alliance e2695 elválasztó modulból és Waters 2414 törésmutató detektorból áll. Az áramlási sebesség 0,5 ml/min volt, az elválasztás tetrahidrofuránnal történt 35 °C-on. A kalibrációhoz polisztirol standardekot használtunk.

Folyadékkromatográfia (HPLC). Az elválasztást a korábban leírt LC-MS rendszerrel végeztük. 10 µl polimer oldatot injektáltunk az 5 °C-os mintatérből. Symmetry SB C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) fordított fázisú oszlopon történt az elválasztás 1 ml/perc áramlási sebességgel, 35 °C-os kolonnatérben. Gradiens módszert alkalmaztunk metanol és 0,1%-os hangyasav eluensekkel, ahol a kezdeti 40% metanol 30 perc alatt változott 70%-ra.

4.3.3. Tömegspektrometriás és tandem MS vizsgálatok

A fragmentációs vizsgálatokhoz a korábban említett Q-TOF tömegspektrométert elektroporlasztásos (ESI), APCI (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) és DART (IonSense, Inc., Saugus, MA, USA) ionforrásokkal használtam.

Elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS). A pEtOx polimer metanol:víz=1:1 eleggyel készült 1 mM koncentrációjú oldatát fecskendőpumpával jutattuk az ionforrásba. A porlasztógáz nyomása 0,3 bar volt. A szárítógázként használt nitrogén hőmérséklete 180 °C volt, és áramlási sebességét 4 l/min-re állítottuk. A mérést pozitív módban végeztük. Ütközési gázként szintén nitrogént használtunk, az ütközési energiát 10 és 80 eV között változtattuk. A prekursorion kiválasztásánál alkalmazott tömegablakot 4 m/z-re állítottuk. A pszeudo MS³ méréseknél az ionforrásban lejátszódó fragmentációt 90-140 eV energiával értük el.

Légköri nyomású kémiai ionizációs tömegspektrometria (APCI-MS). A mintaoldatot 20 µl/min áramlási sebességgel juttattuk a porlasztóba fecskendőpumpa segítségével. Segédoldószerként 0,2 ml/min áramlási sebességgel metanolt alkalmaztunk, ami egy T-csatlakozón keresztül a mintaoldattal együtt került az ionforrásba. Az ionforrás hőmérsékletét 390 °C-ra állítottuk. A porlasztógáz nyomása 2 bar volt. A korona feszültség 5000 V volt. A szárítógázként használt nitrogén hőmérséklete 200 °C volt és áramlási sebessége 6 l/min. A mérést pozitív módban végeztük. Ütközési gázként nitrogént használtunk, az ütközési energiát 10 és 80 eV között változtattuk. A prekursorion kiválasztásánál alkalmazott tömegablakot 4 m/z-re állítottuk. A pszeudo MS³ méréseknél az ionforrásban lejátszódó fragmentációhoz 90-140 eV energiát alkalmaztunk. A tömegspektrumot mérés előtt APCI kalibráló oldattal kalibráltuk.

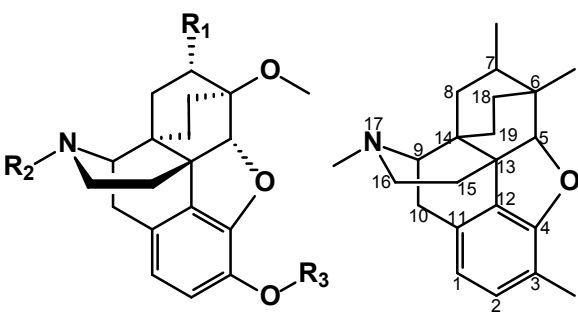
Valós idejű közvetlen analízis (DART). 10 mM koncentrációjú oldattal végeztük a kísérleteket. A DART ionforrást szintén pozitív módban használtuk 350 °C hőmérsékleten. Az ionizáló gázáramhoz 5,5 bar nyomású nagy tisztaságú (>99,999%) héliumot használtunk. A mintaoldatba mártott speciális üvegbotot a gázáramba tartottuk, a felületére tapadt oldat kis mennyisége elegendő a spektrum felvételéhez. A rés a tömegspektrométer belépőnyílása és az ionforrás között 2,5 cm volt, ennek a közepére helyeztük a mintát.

Mátrix segített lézer deszopció/ionizáció (MALDI-MS). A MALDI-MS mérésekhez egy Bruker BIFLEX IIITM tömegspektrométert használtunk, amelyhez egy reflelektronnal felszerelt repülési idő analizátor (TOF) tartozott. A mintákat dihidroxi-benzoészav (DHB) mátrix segítségével készítettük elő. A DHB-t 20 mg/ml-es koncentrációban, tetrahidrofuránban oldottuk fel. A mintából tetrahidrofurán-metanol 4:1 elegyében 10 mg/ml-es koncentrációjú oldatot készítettünk. A mátrix és a minta oldatot 5:1 arányban kevertük össze és 1 µl-ét cseppentettük fel a mintatartó lemezre. Az ionizációhoz használt nitrogén lézer paraméterei: 337 nm hullámhosszúságú fotonok, 3 ns pulzusokban, 10^6 - 10^7 W/cm² közötti energiával. A lézert 4 Hz-en működtettük, és 200 lövést összegeztünk a spektrum felvételéhez. A pozitív töltésű ionokat 19 kV feszültséggel gyorsítottuk pulzáló ionextrakciót (PIETM) használva, és reflelektron módban (20 kV) analizáltuk. A MALDI spektrumok felvétele előtt külső kalibrálást végeztünk a megfelelő tömegpontosság elérése érdekében, ehhez poli-etilén-glikol standardet ($M_n=1450$ g/mol, $M_w/M_n=1,02$) használtunk.

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

5.1. A buprenorfin MS/MS vizsgálata

Az általunk vizsgált vegyületek szerkezeti és összegképlete az 4. ábrán látható. A táblázatban szereplő **5**-ös vegyület a buprenorfin.



	1	2	3	4	5
R₁					
R₂					
R₃					
Összegképlet (M)	C ₂₃ H ₂₉ NO ₄	C ₂₅ H ₃₅ NO ₄	C ₂₆ H ₃₃ NO ₄	C ₃₀ H ₄₃ NO ₄	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄
[M+H]⁺ ion elméleti tömege	384.217	414.264	424.248	482.326	468.311

4. ábra

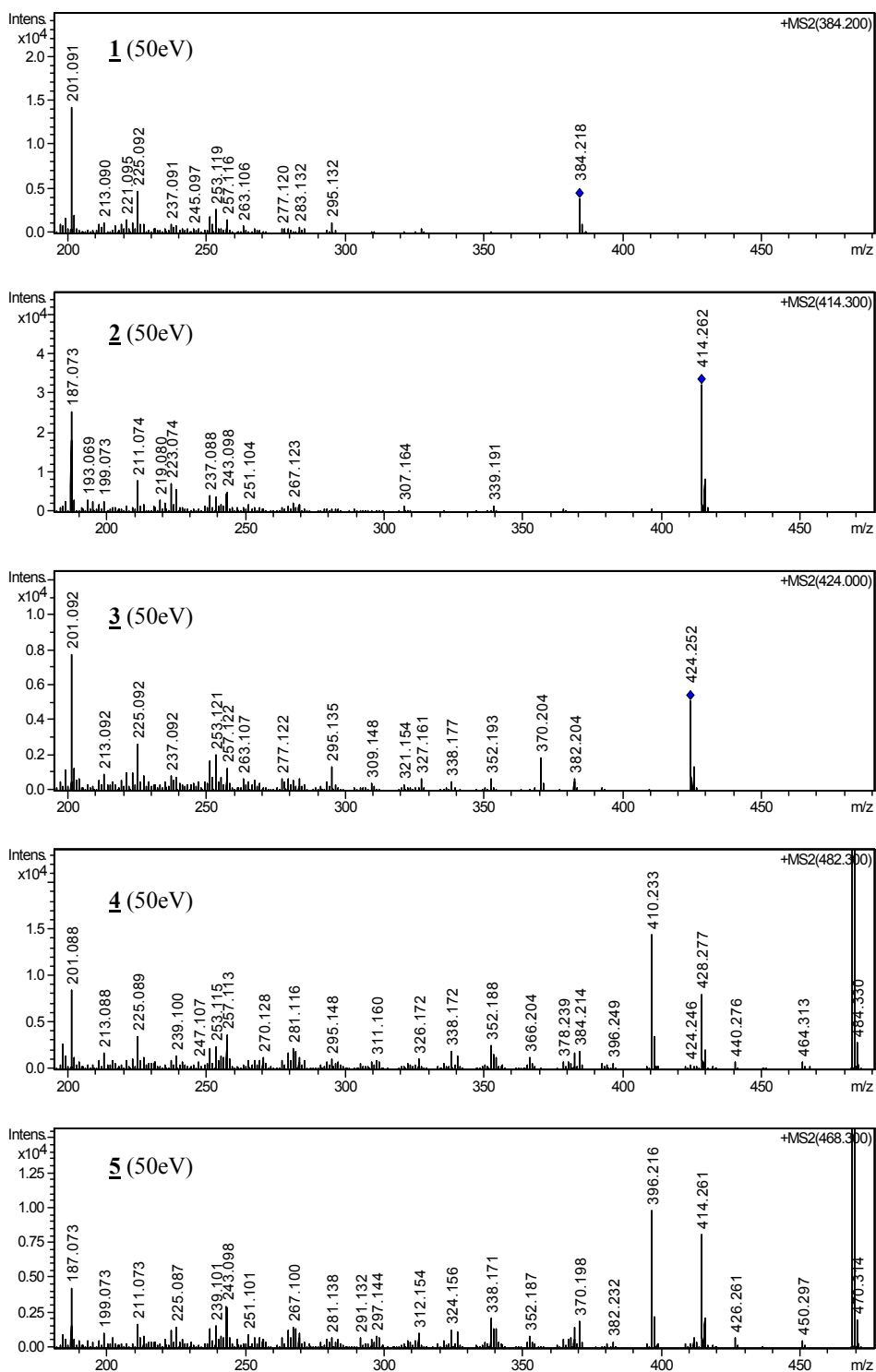
A vizsgált buprenorfin származékok szerkezeti és összegképlete valamint a belőlük ESI-MS körülmények között képződő [M+H]⁺ ionok monoizotópos tömege.

Tömegspektrometriai módszerrel a semleges molekula nem, csak az ebből képződő ionok vizsgálhatóak. Elektroporlasztásos ionizációval ezekből a vegyületekből főként protonált molekulák képződnek, vagyis az ESI-MS spektrumban az [M+H]⁺ ionokhoz tartozó m/z értékű csúcsok a legintenzívebbek. A vizsgált vegyületekből ESI-MS körülmények között képződő addukt ion [M+H]⁺ monoizotópos tömege is szerepel a 4. ábrán.

Az [M+H]⁺ ionok ütközési energiával kiváltott disszociációját, vagyis fragmentációját MS/MS módszerrel vizsgáltuk. Az első kvadrupól analizátorral

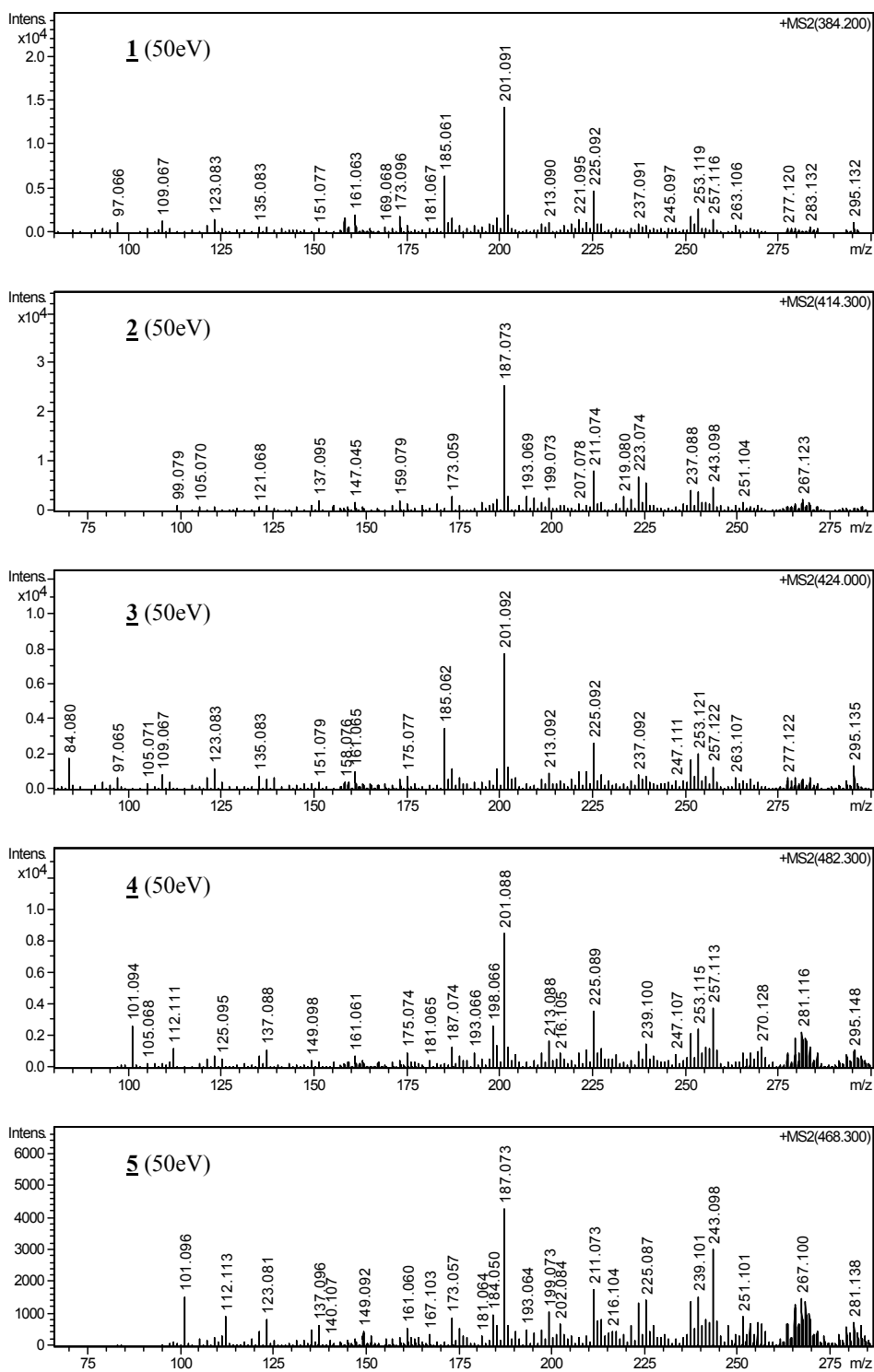
kiválasztott prekursoriont az ütközési cellában különböző energiával gázzal ütköztettük, és a fragmensionokat a második repülési idő analizátorban választottuk el. Az MS/MS spektrumban tehát az adott prekursorionból fragmentációval keletkező ionok tömegei határozhatók meg. Az 5 vizsgált vegyület 50 eV ütközési energiánál felvett MS/MS spektrumai az 5. ábrán láthatóak két tömegtartományban. Mind a nagyobb, mind a kisebb tömegtartományban az x-tengely 14 m/z-vel el van tolva azon vegyületeknél, ahol az R₃ csoport metil.

A 5. ábrán látható, hogy a 4-es és 5-ös vegyületek MS/MS spektrumai szinte teljesen megegyeznek, a 14,015 m/z különbségtől eltekintve, ami abból ered, hogy az R₃ csoport hidrogén, vagy metil csoport. Az 1-es és a 3-as vegyületek MS/MS spektrumai között is nagy a hasonlóság a kisebb tömegtartományban, bár az 1-es vegyületnek kevesebb 295 m/z-nél nagyobb fragmense jelenik meg. Annak ellenére, hogy az R₁ csoport csak a 2-es vegyületnél –C(OH)(Pr)CH₃, mégis számos csúcs megegyezik a 2-es vegyület és a többi buprenorfin származék, főként az 5-ös vegyület MS/MS spektrumában. Az előző megállapítások alapján és mivel kisebb tömegtartományban a vizsgált vegyületek MS/MS spektrumai szinte teljesen megegyeznek, azt feltételezhetjük, hogy a buprenorfin származékok fragmentációja az R₁ és R₂ csoportok lehasadásával kezdődik, majd az összetett gyűrűs váz hasadásával folytatódik, és az –OR₃ csoportot tartalmazó aromás gyűrű csak az utolsó fragmentációs lépésekben vesz részt. Ezek a megállapításokat a morfinan származékok korábbi vizsgálatai is alátámasztják.^{45,46,47} A fragmentációs folyamat részletes tárgyalását ennek megfelelően két részre osztjuk; a fragmentációs folyamatok első lépéseire és a gyűrűs váz fragmentációjára.



5.a ábra

A vizsgált buprenorfin származékok 50 eV-nál felvett MS/MS spektrumai a 200-500 m/z tartományban.



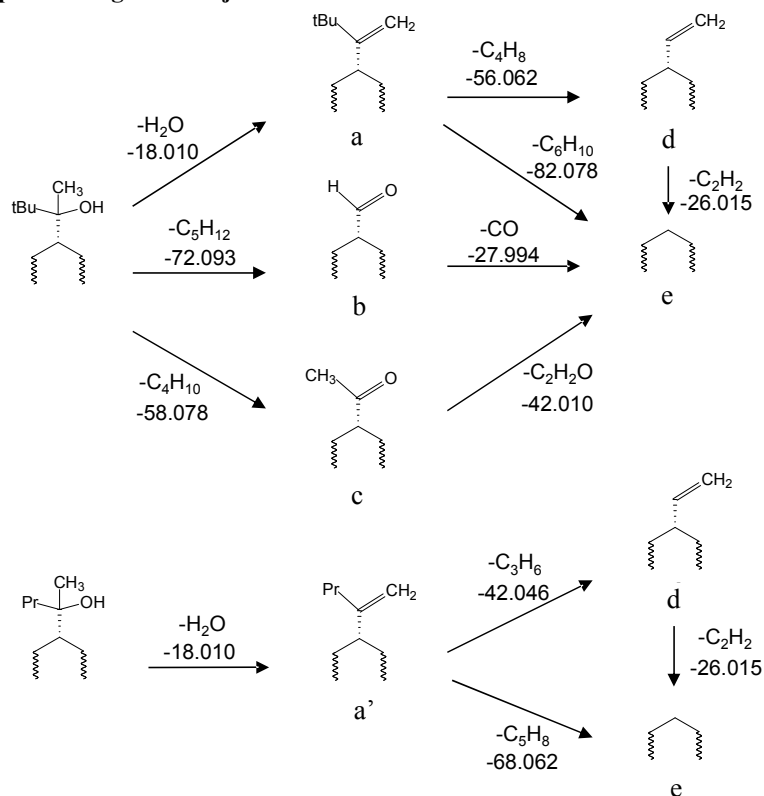
5.b ábra

A vizsgált buprenorfin származékok 50 eV-nál felvett MS/MS spektrumai a 100-300 m/z tartományban.

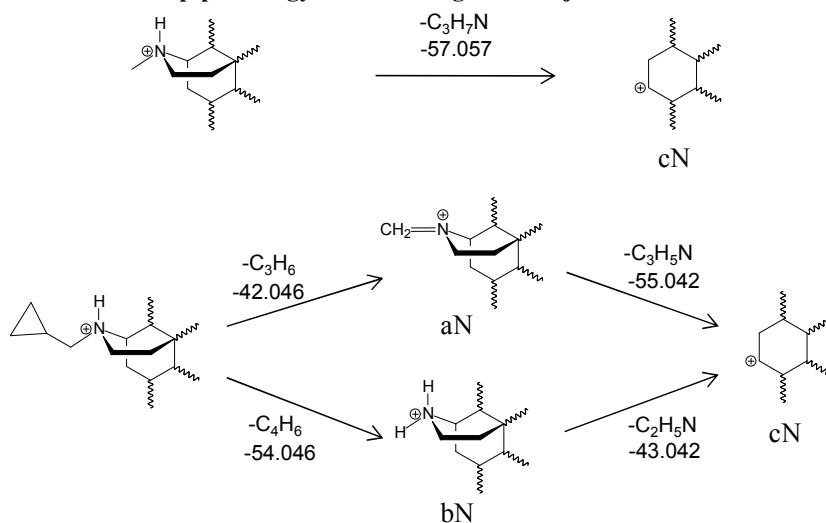
5.1.1. Buprenorfin származékok fragmentációjának első lépései

Kisebb ütközési energiáknál felvett MS/MS spektrumokban a prekursorion intenzitása nagy, és kevés fragmension jelenik meg kicsi intenzitással. Ezek kis energiát igénylő kötéshasadásokkal keletkeznek. Ha növeljük az ütközési energiát, a prekursorion intenzitása csökken, és több kisebb tömegű fragmension jelenik meg nagyobb intenzitással az MS/MS spektrumban. Nem csak a prekursorion fragmentációjából, hanem a fragmensionok további fragmentációjából is keletkeznek kisebb tömegű ionok.

A vizsgált buprenorfin származékok (**1-5**) kis energiánál felvett MS/MS spektrumaiból megállapítható (1. táblázat), hogy az $R_1 = C(OH)(tBu)CH_3$ csoport három párhuzamos úton is lehasadhat. Az $R_1 = C(OH)(Pr)CH_3$ csoport két párhuzamos úton, míg az $R_1 = C(O)CH_3$ csak egy lépésben eliminálódik a gyűrűről (6. ábra). Az R_1 csoport lehasadása végül minden esetben az **e** fragmensionhoz vezet. Fontos megjegyezni, hogy az $R_1 = C(OH)(tBu)CH_3$ csoport fragmentációja során keletkező c-típusú ion (6. ábra) megegyezik azzal a prekursorionnal, ahol $R_1 =$ acetil.

Az R_1 csoportok fragmentációja

Az N-szubsztituált piperidin gyűrűs rész fragmentációja



6. ábra

A vizsgált buprenorfin származékok fragmentációjának első lépései, az R_1 és R_2 csoportok lehasadása.

Az R_2 csoport úgy hasad le, hogy a piperidin gyűrű egy részét is magával viszi. Ha az R_2 csoport ciklopropil-metil, akkor a fragmentáció két úton történhet, ahogy ez a 6. ábrán látható; ha az R_2 csoport metil, akkor egy lépésben metil-aziridin távozik. Mindkét esetben cN fragmentum képződik (6. ábra). Hasonló lépéseket tapasztaltak más korábban vizsgált morfinan származék fragmentációjánál.^{45,46,47}

Az R_1 és R_2 csoport fragmentációjával párhuzamosan a 6-os számú szénatomon lévő metoxi csoport is lehasadhat metanolként. A vizsgált vegyületekből kis energiájú ütközések során az eddig említett kistömegű veszteségek figyelhetők meg. A vizsgált prekursorionokból így képződött összes lehetséges fragmentum elméleti tömegeit foglalja össze az 1. táblázat. A nagyobb intenzitású fragmentumokat szürke háttér emeli ki, és ezek összegképlete is olvasható a táblázatban. Ezek az ionok analitikai szempontból is fontosak az ismeretlen vegyületek azonosításánál. Az MS spektrumban megjelenő ionok tömegéből meg lehet állapítani a vegyület molekulatömegét, valamint elegendő felbontás és pontosság esetén javaslatot lehet tenni a vegyület összegképletére is. A szerkezet felderítéséhez azonban több információra van szükség. A meghatározott körülmények között felvett MS/MS spektrum ujjlenyomat-szerű használata, vagy akár néhány jellegzetes fragmentum jelenléte is elegendő lehet a vegyület azonosítására.

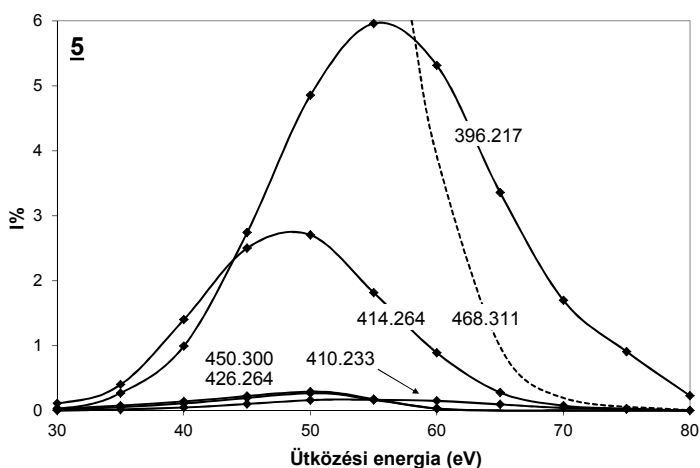
<u>1</u>		cN	–CH ₄ O	cN –CH ₄ O
Prekurzor	384.217 C ₂₃ H ₃₀ NO ₄	327.160	352.191	295.133 C ₁₉ H ₁₉ O ₃
e	342.207	285.150	310.181	253.122 C ₁₇ H ₁₇ O ₂
<u>2</u>		cN	–CH ₄ O	cN –CH ₄ O
Prekurzor	414.264 C ₂₅ H ₃₆ NO ₄	357.207	382.238	325.181
a'	396.253	339.195 C ₂₂ H ₂₇ O ₃	364.228	307.169 C ₂₁ H ₂₃ O ₂
d	354.206	297.149	322.180	265.122 C ₁₈ H ₁₇ O ₂
e	328.191	271.134	296.165	239.107 C ₁₆ H ₁₅ O ₂

1. táblázat

*A vizsgált buprenorfin
származékokból kis energiánál
képződő összes lehetséges
fragmension elméleti tömegei.*

<u>3</u>		aN	bN	cN	–CH ₄ O	aN –CH ₄ O	bN –CH ₄ O	cN –CH ₄ O
Prekurzor	424.248 C ₂₆ H ₃₄ NO ₄	382.201 C ₂₃ H ₂₈ NO ₄	370.201 C ₂₂ H ₂₈ NO ₄	327.159 C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	392.222	350.175 C ₂₂ H ₂₄ NO ₃	338.175 C ₂₁ H ₂₄ NO ₃	295.133 C ₁₉ H ₁₉ O ₃
e	382.238	340.192	328.192	285.149	350.212	308.166	296.166	253.122 C ₁₇ H ₁₇ O ₂
<u>4</u>		aN	bN	cN	–CH ₄ O	aN –CH ₄ O	bN –CH ₄ O	cN –CH ₄ O
Prekurzor	482.326 C ₃₀ H ₄₄ NO ₄	440.280	428.280 C ₂₆ H ₃₈ NO ₄	385.237	450.300	408.254	396.254	353.211
a	464.316 C ₃₀ H ₄₂ NO ₃	422.270	410.270	367.227	432.290	390.244	378.244	335.201
b	410.233 C ₂₅ H ₃₂ NO ₄	368.187	356.187	313.144	378.207	336.161	324.161	281.118 C ₁₈ H ₁₇ O ₃
c	424.248	382.202	370.202	327.159	392.222	350.176	338.176 C ₂₁ H ₂₄ NO ₃	295.133 C ₁₉ H ₁₉ O ₃
d	408.253	366.207 C ₂₃ H ₂₈ NO ₃	354.207 C ₂₂ H ₂₈ NO ₃	311.164 C ₂₀ H ₂₃ O ₃	376.227	334.181	322.181	279.138 C ₁₉ H ₁₉ O ₂
e	382.238 C ₂₄ H ₃₂ NO ₃	340.192 C ₂₁ H ₂₆ NO ₃	328.192	285.149 C ₁₈ H ₂₁ O ₃	350.212	308.166	296.166	253.122 C ₁₇ H ₁₇ O ₂
<u>5</u>		aN	bN	cN	–CH ₄ O	aN –CH ₄ O	bN –CH ₄ O	cN –CH ₄ O
Prekurzor	468.311 C ₂₉ H ₄₂ NO ₄	426.265 C ₂₆ H ₃₆ NO ₄	414.265 C ₂₅ H ₃₆ NO ₄	371.222	436.285	394.239	382.239	339.196 C ₂₂ H ₂₇ O ₃
a	450.301	408.255	396.255 C ₂₅ H ₃₄ NO ₃	353.212	418.275	376.229	364.229	321.186
b	396.218 C ₂₄ H ₃₀ NO ₄	354.172	342.172	299.129	364.192	322.146	310.146	267.103 C ₁₇ H ₁₅ O ₃
c	410.233	368.187	356.187	313.144	378.207	336.161	324.161 C ₂₀ H ₂₂ NO ₃	281.118
d	394.238	352.192 C ₂₂ H ₂₆ NO ₃	340.192 C ₂₁ H ₂₆ NO ₃	297.149 C ₁₉ H ₂₁ O ₃	362.212	320.166	308.166	265.123 C ₁₈ H ₁₇ O ₂
e	368.223 C ₂₃ H ₃₀ NO ₃	326.177 C ₂₀ H ₂₄ NO ₃	314.177	271.134	336.197	294.151	282.151	239.108 C ₁₆ H ₁₅ O ₂

Mint azt már korábban említettük, a buprenorfin származékok fragmentációjakor az R_1 és R_2 csoportok valamint a 6-os szénatomon lévő metoxi csoport lehasadása párhuzamosan történik. Azért, hogy meghatározzuk az elsődleges folyamatokat, megvizsgáltuk az MS/MS spektrumban megjelenő ionok intenzitásának ütközési energia függését, vagyis a letörési görbéket. Az **1** és **5** vegyületek néhány fragmensionjának görbéje látható a 7. ábrán.



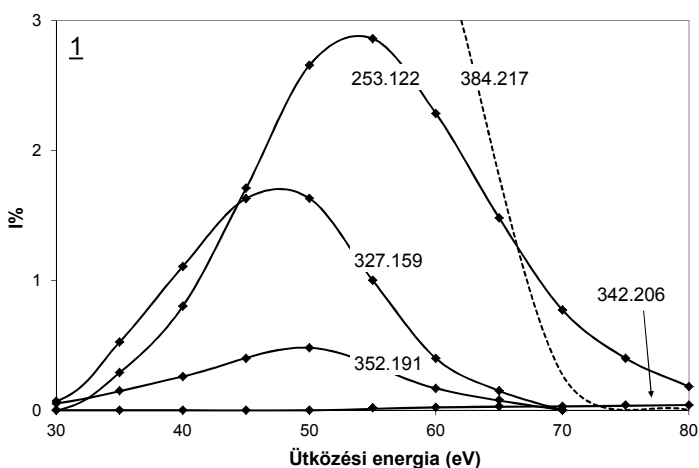
7. ábra

*A buprenorfin (**5**) fragmentációjának első lépéseiből keletkező ionok letörési görbéi.*

A 7. ábrán látható a buprenorfinból képződő prekursorion $[M+H]^+$ (468,311 m/z) és 5 fragmensének letörési görbéje, melyek tömegei: 450,300 m/z (**a**, víz vesztes), 426,264 m/z (**aN**, ciklopropán vesztes), 414,264 m/z (**bN**, metilén-ciklopropán vesztes), 410,233 m/z (**c**, 2-metil-propán vesztes) és 396,217 m/z (**b**, 2,2-dimetil-propán vesztes). Az a fragmension (436,285 m/z), ami akkor jön létre, amikor a prekursorionból közvetlenül metanol eliminálódik, a teljes vizsgált ütközési energia tartományban elhanyagolható intenzitású. A 7. ábra értelmezéséhez két párhuzamosan lejátszódó fragmentációs folyamatot kell megfigyelnünk. Az egyik a **bN**-típusú fragmens képződéséhez vezető metilén-ciklopropán vesztes, a másik a **b**-típusú fragmens képződéséhez vezető 2,2-dimetil-propán eliminációja. A megjelenési energiák alapján feltételezzük, hogy a buprenorfin fragmentációja során első lépésben az R_2 csoport hasad le. A letörési görbék alapján valószínű, hogy ez elsődlegesen a **bN** fragmension képződésén keresztül történik. Az $R_1 = C(OH)(tBu)CH_3$ csoport többlépéses disszociációja

csak ezután kezdődik, főként C_5H_{12} lehasadásával, ami **b**-típusú fragmensionnt eredményez. A metanol lehasadása csak utolsó lépésként történik, főként a **b/cN**- és az **e/cN**-típusú fragmensekből. A bután vesztes csak magasabb ütközési energiánál jelenik meg (**c**-típusú fragmensionnt eredményezve). Az adott fragmentációs körülmények között az $R_1 = C(OH)(tBu)CH_3$ csoport átalakulása $R_1 = C(O)CH_3$ csoporttá elhanyagolható.

A **2** és **4** prekursorionok kis energiájú fragmenseihez tartozó letörési görbék alapján megállapítható, hogy a fragmentáció a buprenorfinhoz hasonlóan indul. Attól függetlenül, hogy az $R_1 = C(OH)(tBu)CH_3$ vagy $R_1 = C(OH)(Pr)CH_3$, először az R_1 és az R_2 csoport lehasadása kezdődik el, ezt követően pedig metanol vesztes következik. Az $R_2 =$ ciklopropil-metil csoport cseréje metil csoportra sem okoz eltérést a fragmentációs mechanizmusban. Érdekes megemlíteni, hogy egyes esetekben a C(18)-C(19) szénatomok közötti etilén híd lehasadása kompetitív folyamata a C(6) szénatomon lévő metoxi csoport fragmentációjának. Az etilén híd lehasadásakor a távozó csoport C_2H_6 és a keletkező fragmension m/z értéke 1,979 m/z távolságra van a metanol lehasadásakor keletkező fragmensiontól.



8. ábra

Az **1** vegyület fragmentációjának első lépéseiben keletkező ionok letörési görbéi.

Az **1** és **3** vegyületek esetén, ahol az $R_1 = C(O)CH_3$, a fragmentáció kezdete eltér a buprenorfinnál tapasztalttól. A letörési görbe azt mutatja (8. ábra), hogy az **e**-típusú fragmension (342,206 m/z) intenzitása nagyon kicsi, és csak nagy ütközési energiánál, 50 eV-nál jelenik meg. A legintenzívebb fragmension

(253,122 m/z) már 20 eV-nál képződik. Ennél a fragmensionnál már a metanol, az R₂ csoport a piperidin gyűrű egy részével együtt és az R₁ csoport is lehasadt. Ez azt jelenti, hogy közvetlenül az **1** prekursorionból (384,217 m/z) nem hasad le a C₂H₂O. Vagyis abban az esetben, amikor az R₁ = C(O)CH₃ (**1** és **3** vegyület), akkor ez a csoport csak a C(6) metoxi és az R₂ csoport fragmentációját követően hasad le.

Ha tovább vizsgáljuk az **1** és **3** vegyületek MS/MS spektrumának ütközési energia függését megállapíthatjuk, hogy még a gyűrűs alapváz kötéseinek a hasadása is megelőzheti az R₁ = acetyl csoport fragmentációját (lásd később).

5.1.2. A kondenzált gyűrűs alapváz fragmentációja

A vizsgált öt vegyület kondenzált gyűrűs alapváza megegyezik (R₃ = H vagy R₃ = CH₃ különbségtől eltekintve), így az R₁ és R₂ csoportok fragmentációja után keletkező ion azonos (239 illetve 253 m/z). Ennek megfelelően a nagyobb energiájú fragmentáció során keletkező kisebb tömegű ionok nagy része analóg vagy megegyezik. A kondenzált gyűrűs alapváz fragmentációjának lépéseit a 9. ábra foglalja össze. Az ábrán a fragmensionok szerkezeti képlete, összegképlete és monoizotópos tömege is szerepel. A fragmensek egyértelmű azonosítására nagy betűket alkalmaztunk. A legintenzívebb fragmenseket vastag vonallal és aláhúzott betűvel emeltük ki. A betű melletti csillag arra utal, hogy az MS/MS spektrumokban a két hidrogénnel kevesebbet tartalmazó fragmension is megtalálható. A felkiáltójel pedig azt jelenti, hogy az adott fragmension az **1** és **3** vegyületeknél + 42,010 m/z-nél is megjelenik, vagyis ahol a C(7) szénatomról még nem hasadt le az acetyl csoport (R₁). Az ábrán nem csak a fragmensek szerkezete, hanem az is látható, hogy miből keletkeznek, ezt a későbbiekben részletesen tárgyaljuk.

A legintenzívebb fragmensek, amelyeket vastag vonallal és aláhúzott betűjellel emeltünk ki, analitikai szempontból fontosak. A buprenorfin (**5**) fragmentációjának jelen vizsgálatokor javasolt fragmension szerkezetek jól egyeznek a már vizsgált hasonló morfinan származékoknál javasolt szerkezetekkel.^{44,45,46,47}

A buprenorfin fragmentációja során képződött összes azonosított iont a 2. táblázatba gyűjtöttük össze. Az egyszeresen pozitív töltésű kationok elméleti tömege mellett az összegképlet és a korábbiakban használt jelük szerepel.

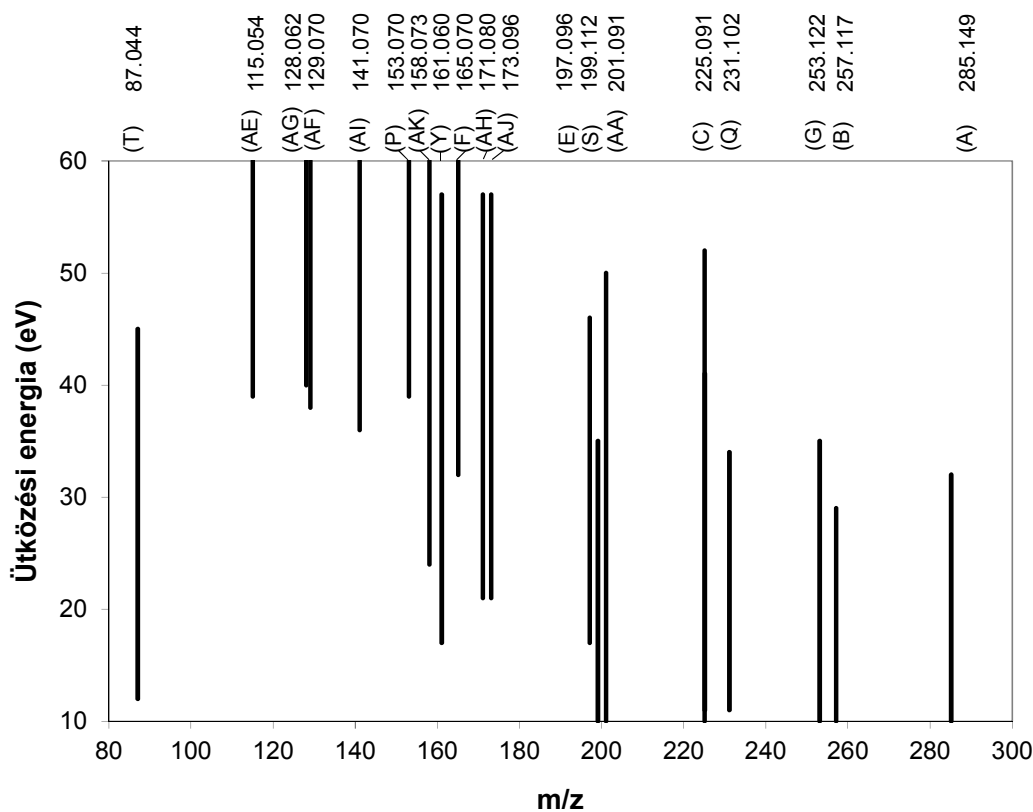
9. ábra
*A kondenzált gyűrűs
alapváz fragmentációja.*

2. táblázat A buprenorfin összes azonosított fragmensionjának elméleti tömege

m/z	Összegképlet	Jel	Megjegyzés	m/z	Összegképlet	Jel	Megjegyzés
468.311	C ₂₉ H ₄₂ NO ₄	Precursor		267.102	C ₁₇ H ₁₅ O ₃		b/cN-MeOH
450.300	C ₂₈ H ₄₀ NO ₃	a		265.122	C ₁₈ H ₁₇ O ₂		d/cN-MeOH
436.285	C ₂₈ H ₃₈ NO ₃		Pr-MeOH	263.107	C ₁₈ H ₁₅ O ₂		d/cN-MeOH-2H
426.264	C ₂₆ H ₃₆ NO ₄	aN		263.107	C ₁₈ H ₁₅ O ₂	I*	
418.274	C ₂₈ H ₃₆ NO ₂		a-MeOH	253.122	C ₁₇ H ₁₇ O ₂		c/cN-MeOH-CO
414.264	C ₂₅ H ₃₆ NO ₄	bN		253.086	C ₁₆ H ₁₃ O ₃	C*	c/cN-MeOH-C ₂ H ₄
410.233	C ₂₅ H ₃₂ NO ₄	c		243.102	C ₁₅ H ₁₅ O ₃	B	
408.253	C ₂₆ H ₃₄ NO ₃	a/aN		241.086	C ₁₅ H ₁₃ O ₃		B-2H
396.253	C ₂₅ H ₃₄ NO ₃	a/bN		239.107	C ₁₆ H ₁₅ O ₂	G	e/cN-MeOH
396.217	C ₂₄ H ₃₀ NO ₄	b		239.107	C ₁₆ H ₁₅ O ₂		D*+2H
394.238	C ₂₅ H ₃₂ NO ₃		aN-MeOH	237.091	C ₁₆ H ₁₃ O ₂		G-2H
394.238	C ₂₅ H ₃₂ NO ₃	d		237.091	C ₁₆ H ₁₃ O ₂	D*	
382.238	C ₂₄ H ₃₂ NO ₃		bN-MeOH	235.112	C ₁₇ H ₁₅ O	J*	
378.206	C ₂₄ H ₂₈ NO ₃		c-MeOH	221.096	C ₁₆ H ₁₃ O	I	
376.227	C ₂₅ H ₃₀ NO ₂		a/aN-MeOH	217.086	C ₁₃ H ₁₃ O ₃	Q	
371.222	C ₂₃ H ₃₁ O ₄	cN		211.112	C ₁₅ H ₁₅ O	H	
370.201	C ₂₂ H ₂₈ NO ₄		c/aN+2H	211.075	C ₁₄ H ₁₁ O ₂	C	
368.222	C ₂₃ H ₃₀ NO ₃	e		209.060	C ₁₃ H ₉ O ₂		C-2H
368.186	C ₂₂ H ₂₆ NO ₄	c/aN		199.075	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	N	
366.206	C ₂₃ H ₂₈ NO ₃		a/bN-C ₂ H ₆	197.060	C ₁₃ H ₉ O ₂		N-2H
364.227	C ₂₄ H ₃₀ NO ₂		a/bN-MeOH	193.101	C ₁₅ H ₁₃	J	
364.191	C ₂₃ H ₂₆ NO ₃		b-MeOH	193.065	C ₁₄ H ₉ O	D	
362.211	C ₂₄ H ₂₈ NO ₂		d-MeOH	187.075	C ₁₂ H ₁₁ O ₂	AA	
356.186	C ₂₁ H ₂₆ NO ₄	c/bN		185.096	C ₁₃ H ₁₃ O	S	
354.170	C ₂₁ H ₂₄ NO ₄	b/aN		185.060	C ₁₂ H ₉ O ₂	Z	
353.211	C ₂₃ H ₂₉ O ₃	a/cN		184.052	C ₁₂ H ₈ O ₂	K	
352.191	C ₂₂ H ₂₆ NO ₃	d/aN		183.080	C ₁₃ H ₁₁ O	E	
342.170	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	b/bN		181.065	C ₁₃ H ₉ O		E-2H
340.191	C ₂₁ H ₂₆ NO ₃	d/bN		181.065	C ₁₃ H ₉ O	O	
339.195	C ₂₂ H ₂₇ O ₃		cN-MeOH	179.086	C ₁₄ H ₁₁	R	
338.175	C ₂₁ H ₂₄ NO ₃		e-C ₂ H ₆	175.075	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	V	
336.196	C ₂₂ H ₂₆ NO ₂		e-MeOH	173.060	C ₁₁ H ₉ O ₂	W	
336.159	C ₂₁ H ₂₂ NO ₃		c/aN-MeOH	171.080	C ₁₂ H ₁₁ O	AH	
326.175	C ₂₀ H ₂₄ NO ₃	e/aN		171.044	C ₁₁ H ₇ O ₂	X	
324.159	C ₂₀ H ₂₂ NO ₃		c/bN-MeOH	169.065	C ₁₂ H ₉ O	AB	
322.144	C ₂₀ H ₂₀ NO ₃		b/aN-MeOH	165.070	C ₁₃ H ₉	F	
321.185	C ₂₂ H ₂₅ O ₂		a/cN-MeOH	161.060	C ₁₀ H ₉ O ₂	AC	
320.165	C ₂₁ H ₂₂ NO ₂		d/aN-MeOH	159.080	C ₁₁ H ₁₁ O	AJ	
314.175	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃	e/bN		158.073	C ₁₁ H ₁₀ O	AK	
313.143	C ₁₉ H ₂₁ O ₄	c/cN		153.070	C ₁₂ H ₉	P	
312.159	C ₁₉ H ₂₂ NO ₃		e/bN-2H	147.044	C ₉ H ₇ O ₂	Y	
310.144	C ₁₉ H ₂₀ NO ₃		b/bN-MeOH	143.049	C ₁₀ H ₇ O	AD	
308.165	C ₂₀ H ₂₂ NO ₂		d/bN-MeOH	141.070	C ₁₁ H ₉	AI	
299.128	C ₁₈ H ₁₉ O ₄	b/cN		129.070	C ₁₀ H ₉	AF	
297.149	C ₁₉ H ₂₁ O ₃	d/cN		128.062	C ₁₀ H ₈	AG	
296.128	C ₁₈ H ₁₈ NO ₃		e/aN-C ₂ H ₆	123.080	C ₈ H ₁₁ O	L	
294.149	C ₁₉ H ₂₀ NO ₂		e/aN-MeOH	115.054	C ₉ H ₇	AE	
282.149	C ₁₈ H ₂₀ NO ₂		e/bN-MeOH	101.096	C ₆ H ₁₃ O		
281.117	C ₁₈ H ₁₇ O ₃		c/cN-MeOH	97.065	C ₈ H ₉ O	U	
271.133	C ₁₇ H ₁₉ O ₃	A (e/cN)		91.054	C ₇ H ₇	M	
269.117	C ₁₇ H ₁₇ O ₃		A-2H	87.044	C ₄ H ₇ O ₂	T	

A kondenzált gyűrűs alapváz fragmentációját részletesen tanulmányozhatjuk pszeudo MS³ mérések segítségével. Azt, hogy milyen tömegű fragmensek keletkeznek a prekursorionból az MS/MS spektrumból láthatjuk, de ha a fragmentációs útvonalakat szeretnénk feltérképezni, vagyis az egymás utáni fragmentációs lépéseket akarjuk meghatározni, akkor MS³ méréseket kell végeznünk. Q-TOF analízátorral és kvadрупól ütközési cellás készülékkel ezt úgy lehet megoldani, hogy a fragmensiont már az ionforrásban előállítjuk, és az első kvadрупól analízátorral ezt választjuk ki, és engedjük az ütközési cellába, majd a második repülési idő analízátorral ennek a fragmenseit detektáljuk. Ezt pszeudo MS³ módszernek nevezik. A buprenorfin és származékainak közös fragmentációs lépéseit ezzel a módszerrel vizsgáltuk. Felvettük a következő fragmensionok pszeudo MS³ spektrumát: 285 m/z (**A**), 257 m/z (**B**), 253 m/z (**G**), 201 m/z (**AA**) és 185 m/z (**X**) az **1** vegyület esetén valamint 243 m/z (**B**), 239 m/z (**G**), 211 m/z (**C** és **H**), 193 m/z (**D** és **J**) és 187 m/z (**AA**) az **5** vegyület esetén.

Ahogy az várható volt, a legtöbb kisebb tömegű fragmension megjelenik az **A** fragmension pszeudo MS³ spektrumában, hiszen ez az ion nem más, mint a teljes alapváz, csak az R₁ csoport és az R₂ csoport a piperidin gyűrű egy részével együtt hiányzik róla, amelyek fragmentációját az előző fejezetben tárgyaltuk. Az **A** (285.149 m/z) pszeudo MS³ spektrumának az energiafüggését a 10. ábra foglalja össze.



10. ábra

Kétdimenziós ábra, amely az ütközési energia függvényében mutatja az A ion (285.149 m/z) pszeudo MS³ spektrumában megjelenő fragmenseket.

10-60 eV ütközési energia tartományban 2,5 eV-onként rögzítettük a pszeudo MS³ spektrumokat. Ábrázolva a tömeg/töltés és az ütközési energia függvényében a relatív intenzitást egy háromdimenziós ábrát kapunk (a fragmensek letörési görbéje egy ábrán). Ezt levetítve az ütközési energia és m/z síkra, egy kétdimenziós ábrához jutunk.⁴³ Azért, hogy átlátható legyen az ábra, csak a 20 legintenzívebb fragmensionnt tüntettük fel. Az adott fragmensionnál akkor van jel, ha a spektrumban a relatív intenzitása nagyobb, mint 1%.

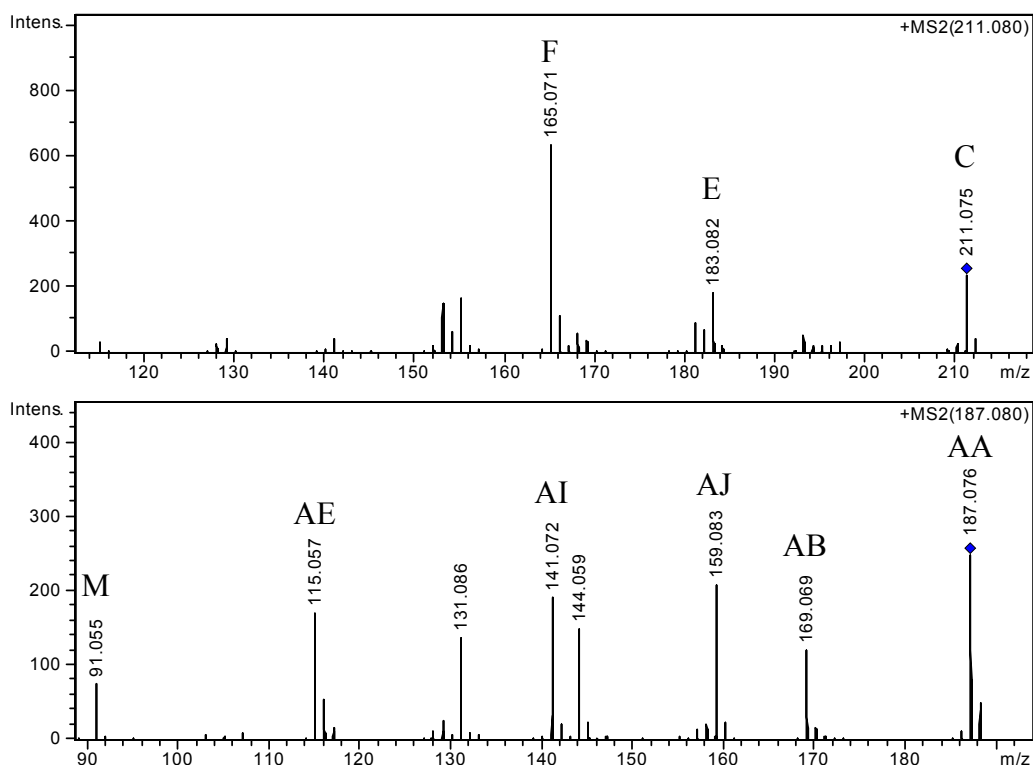
A fragmensek megjelenési energiájuk alapján csoportokba oszthatók, így a képződésük sorrendjéről kaphatunk információt.^{112,113} Lehetnek első generációs (pl.: B, G, Q, C, AA, S, T), második generációs (pl.: E, AJ, AH, Y, AK) és harmadik generációs (pl.: F, P, AI, AF, AG, AE) fragmensionok.

Ezen főbb fragmensek szerkezetét, keletkezésükhöz vezető fragmentációs lépéseket és különböző reakció utakat a már bemutatott 9. ábra tartalmazza. A javasolt szerkezeteket és fragmentációs lépéseket az említett pszeudo MS³

mérésekkel támasztottuk alá. A részletes tárgyaláskor a fontosabb fragmensionok keletkezésére térünk ki, és a megjelenési energiák alapján haladunk.

Ahogy az várható volt, azok a prekurzorionok, amik csak az R_3 (hidrogén vagy metil) szubsztituensben különböznek, teljesen azonos módon fragmentálódnak, eltekintve néhány egyedi fragmensiontól, ami csak az $R_3 = CH_3$ esetén jelenik meg az MS/MS spektrumban. Az **A** fragmensionból etén veszteséssel kapjuk a **B** iont. A **C** fragmension az **A** ionból etén és metanol konszekutív lehasadásával keletkezhet. Ha pedig az **A** fragmensionból először hasad le a metanol, akkor jutunk a **G** ionhoz. A **C** fragmension kialakulásához vezető konszekutív reakciókat az is alátámasztja, hogy a **B** és a **G** fragmensionok pszeudo MS^3 spektrumában is megjelenik a **C** ion.

A **H** fragmension nincs jelen a **B** pszeudo MS^3 spektrumában még kisebb ütközési energiánál sem, de a **G** ionból képződik, mégpedig szén-monoxid eliminációjával. A kisebb tömegű **F** fragmension viszont a **B** és a **G** ionokból is keletkezhet. Ez azt jelenti, hogy a **B** ionból az **F** fragmension más fragmentációs úton, a **C** ionon keresztül keletkezik, nem a **H** ionon keresztül. **G** ionból pedig a **H** ionon keresztül. A **C** ion pszeudo MS^3 spektruma látható a 11. ábrán felül. Mindkét esetben a **C** ionból és a **H** ionból is először az **E** fragmension keletkezik, és ebből metanol veszteséssel jutunk az **F** ionhoz. A **G** fragmensionból még egy további úton eljuthatunk az **F** ionhoz: Első lépésben az R_3 csoport távozik metanolként (**I** fragmension eredményez), majd szén-monoxid lép ki (**J** fragmensiont kapjuk), és végül etén hasad le. Meg kell jegyezni, hogy a **G** ion pszeudo MS^3 spektrumában a **J** ion intenzitása sokkal nagyobb, mint az **F** ion intenzitása, ami arra utal, hogy a **J** ion stabilabb.

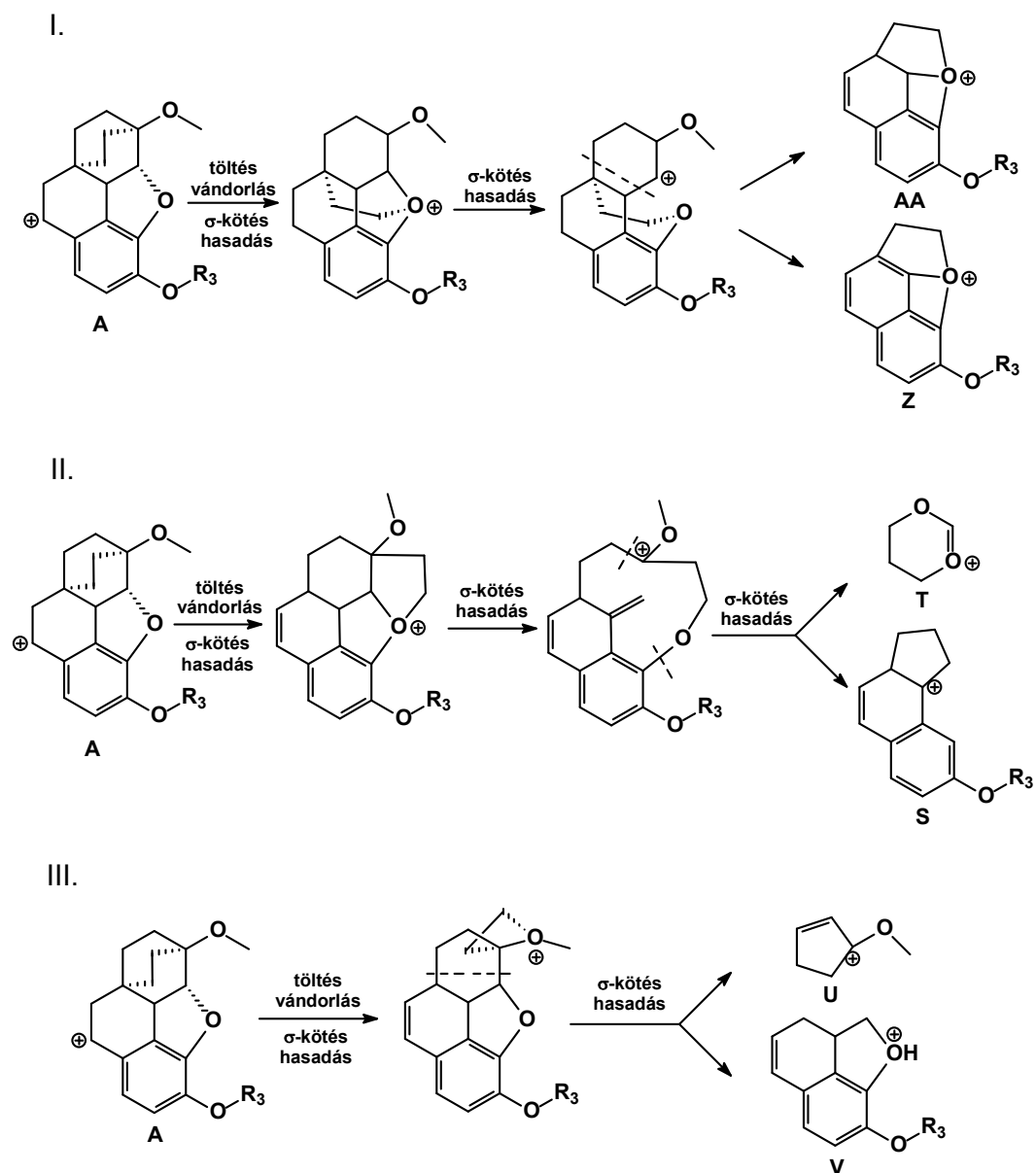


11. ábra

*A buprenorfin C (felül) és AA (alul) fragmensionjának pseudo MS³ spektruma.
(A szerkezeteket lásd a 9. ábrán.)*

Az **AA** és a **Z** fragmensionok minden vizsgált prekursorion MS/MS spektrumában megtalálhatóak, azonban sem a **B**, sem a **G** fragmensionok pseudo MS³ spektrumában nincsenek jelen. Ebből következik, hogy az **AA** és a **Z** ionok közvetlenül az **A** fragmensionból keletkeznek. Kialakulásukhoz a C(18)-C(19)-ből álló etilén híd és a C(6)-on lévő metoxi csoport együttes jelenléte szükséges. Nem keletkeznek a **B** ionból, amiről csak az etilén híd hiányzik, és a **G** ionból sem keletkeznek, amiről pedig csak a C(6) metoxi csoport hiányzik (az **A** ionhoz képest). 11. ábrán alul látható az **AA** ion pseudo MS³ spektruma, amelyben különböző naftalin származékok és gyökös fragmensionok is megjelennek. A megfigyelések alapján javaslatot tettünk az **AA** és a **Z** fragmensionok szerkezetére és kialakulásuk mechanizmusára is (12. ábra I. sor). Első lépésként a C(6) és C(18) közötti egyszeres kötés felhasad, és pozitív töltés a furán típusú O-re vándorol. Ezt követően a szaggatott vonal menti egyszeres kötések felhasadása után kapjuk az **AA** vagy a **Z** fragmensionot, amelyek csak egy kötés telítettségében térnek el. A javasolt mechanizmusban az etilén híd szerepe egyértelmű, hiszen

része a fragmensionnak. A C(6) metoxi csoport nélkül pedig az első lépésként javasolt kötéstrendeződés nem mehetne végbe.



12. ábra

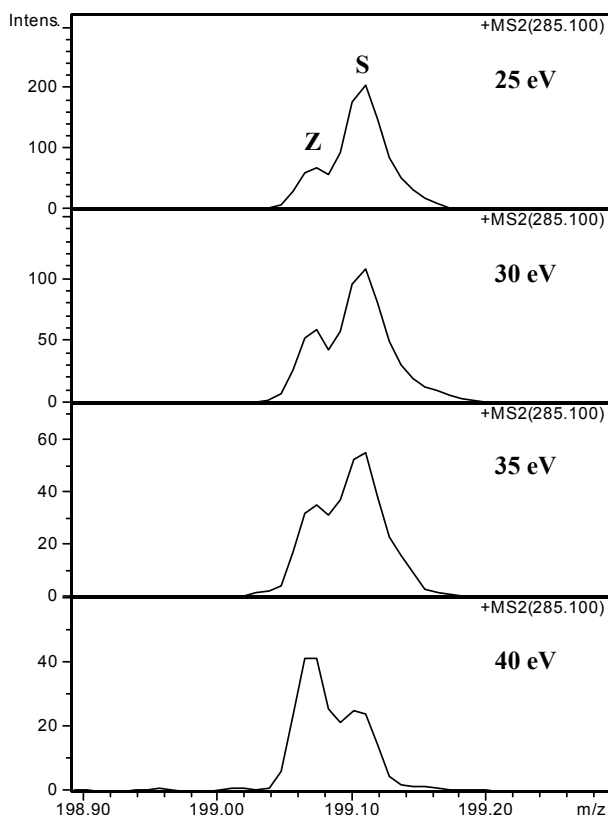
Az AA és Z (I. sor), a T és S (II. sor) valamint az U és V (III. sor) fragmensionok képződésére javasolt mechanizmus.

A **T** ionra különleges figyelmet szenteltünk, hiszen az **A** ion pszeudo MS^3 spektrumában viszonylag nagy intenzitással jelent meg 87,044 m/z értéknél. A mért pontos tömegből arra lehet következtetni, hogy összegképlete $C_4H_7O_2$. További információt nyerhetünk az ionhoz tartozó letörési görbéből. A **T** fragmension megjelenési energiája és intenzitásának maximuma teljesen megegyezik az **S** ion letörési görbéjéből leolvasható adatokkal. Az is közös a két ionban, hogy csak az **A** fragmension pszeudo MS^3 spektrumában jelennek meg, a többi vizsgált fragmens esetén nem. Ez, és a letörési görbék azonos lefutása arra utal, hogy a két ion azonos mechanizmus alapján képződik. Ahogy a 12. ábra II. sorában látható, a mechanizmus első lépése hasonló az **AA** és **Z** fragmensionok esetén javasolthoz, vagyis az etilén híd átrendeződésével indul a folyamat. A **T** és **S** ionok képződésénél a C(14) és C(19) közötti egyszeres kötés hasad fel, és a C(19) atom a furán típusú oxigénhez vándorol. Ezt követi a C(5) és a furán típusú oxigén közötti, valamint a szaggatott vonal menti egyszeres kötések hasadása, majd végül gyűrűzárással kialakul a **T** fragmension. Ha a töltés az eredeti gyűrűs szerkezeten marad, akkor jutunk az **S** ionhoz. Fontos kiemelni, hogy az **S** és **T** fragmensionok relatív intenzitása függ annak a valószínűségétől, hogy a töltés melyik termékre kerül a fragmentációs lépések során. Kis ütközési energiánál az **S/T** intenzitás arány nagyobb, ami arra utal, hogy a kötéshasadásokat követően a pozitív töltés a kedvezményezetten a nagyobb gyűrűs szerkezeten marad, így több **S** fragmenst látunk, mint **T** iont. Nagyobb ütközési energiánál az **S/T** intenzitás arány csökken, aminek az lehet az oka, hogy a **S** fragmens stabilitása kisebb, vagyis könnyebben tovább fragmentálódik.

A kísérleti eredményekből arra lehet következtetni, hogy az **U** és **V** ionok, hasonlóan az **S** és **T** ionokhoz, az **A** fragmensionból közvetlenül keletkeznek egyazon fragmentációs reakció során. A javasolt mechanizmust a 12. ábra III. sorában tüntettük fel. Ebben az esetben a C(14) és C(19) közötti szigma kötés hasadása után az etilén híd nem a furán típusú oxigénre kapcsolódik, hanem a C(6) lévő metoxi csoport oxigénjéhez, és a gyűrűhasadása után kapjuk az **U** vagy a **V** iont, attól függően, hogy a töltés melyik fragmens részen marad. Az ütközési energia függést megvizsgálva, hasonló következtetésre juthatunk, mint az **S** és **T** ionok esetében: a pozitív töltésű kation kialakulása a nagyobb gyűrűs szerkezeten kedvezményezett. Ezért a **V** ion kisebb energiánál nagyobb intenzitásban jelenik meg, mint az **U** fragmens, de a további fragmentációra érzékenyebb, tehát nagyobb energiánál csökken az intenzitásuk aránya.

A fragmentáció utolsó fázisában, 80 eV körüli ütközési energiánál számos kis tömegű, aromás fragmension képződik, többek között a tropílium ion (**M**) és a naftalin gyökkation (**AG**).

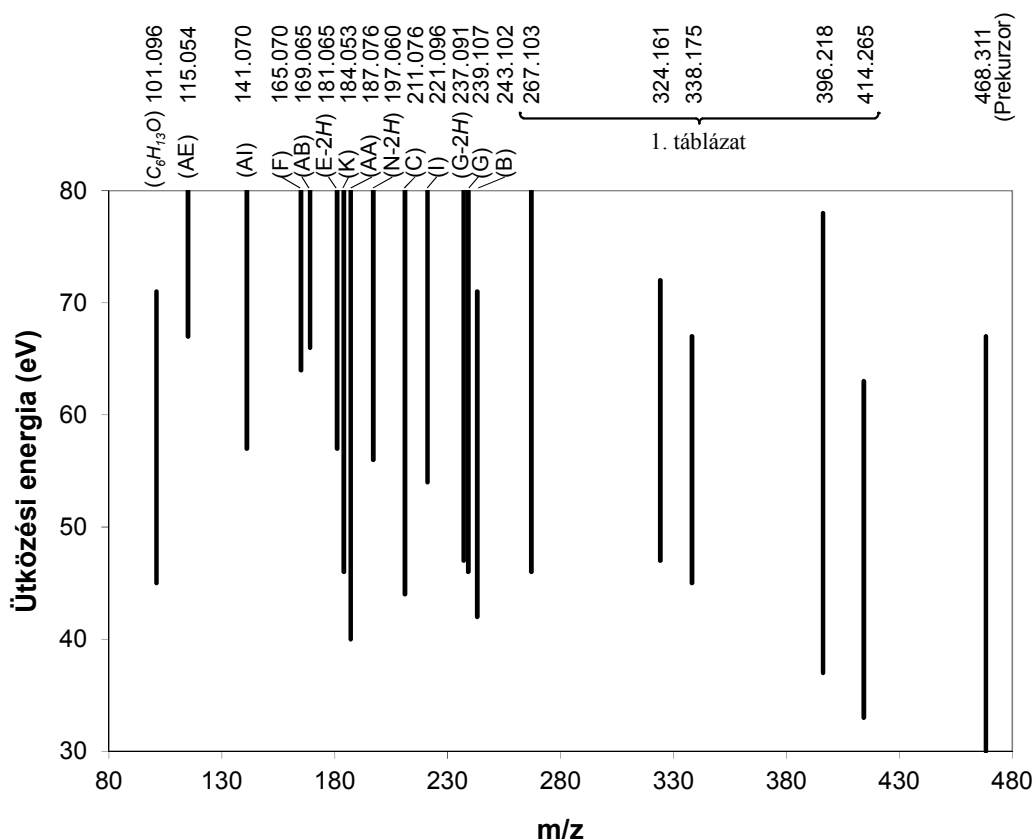
A **1** és **5** vegyületek **C** (225 m/z), **Z** (199 m/z) és **D** (193 m/z) fragmenseiből felvett pszeudo MS³ spektrumok kiértékelésekor, első ránézésre ellentmondásos eredményeket is kaptunk. Az előbbi ionok javasolt szerkezetei alapján nem várt fragmensionok is megjelentek az MS³ spektrumokban. Alaposabban megvizsgálva az **1** prekursorion MS/MS spektrumát, azt állapítottuk meg, hogy a 225, 199 és 193 m/z értékeknél dupla csúcsok szerepeltek. A **C** (225,091 m/z, C₁₅H₁₃O₂) és a **H** (225,127 m/z, C₁₆H₁₇O); az **S** (199,112 m/z, C₁₄H₁₅O) és a **Z** (199,075 m/z, C₁₃H₁₁O₂) valamint a **D** (193,065 m/z, C₁₄H₉O) és a **J** (193,101 m/z, C₁₅H₁₃) fragmensionok jelei átfedtek egymással az alkalmazott felbontásnál. Nagyobb felbontású analizátorral a fenti ionpárok természetesen különálló jeleket adnának a tömegspektrumban. Ezért amikor a pszeudo MS³ mérésekhez kiválasztottuk a **C**, **Z** és **D** ionokat prekursorionként, egyszerre láttuk ezek és a tömeghez páronként hozzájuk közel álló **H**, **S** és **J** ionok fragmenseit a spektrumban. Ez okozta az ellentmondást. A különböző összegképletű, de azonos nominális tömegű fragmensek jelenlétét **1** és **5** MS/MS spektrumában minden esetben ütközési energia függés vizsgálatával igazoltuk. A különböző ütközési energiánál felvett MS/MS spektrum a 199-es nominális tömegnél kinagyítva látható a 13. ábrán. Az ábra azt mutatja, hogyan változik a két hasonló tömegű **S** és **Z** fragmens intenzitása az ütközési energia növelésével.



13. ábra

*A **Z** ($C_{13}H_{11}O_2$; m/z 199,075) és **S** ($C_{14}H_{15}O$; m/z 199,112) fragmensionok intenzitásának változása az ütközési energia növelésével.*

A buprenorfin (**5**) 20 legintenzívebb fragmensionját foglalja össze a 14. ábra, amely a 10. ábrával analóg módon a tömeg/töltés és az ütközési energia síkjára vetíti le a fragmensionok letörési görbéjét.⁴³ A kétdimenziós ábrához 30-80 eV ütközési energia tartományban 2,5 eV-onként rögzítettük az MS/MS spektrumokat. Az adott fragmensnél akkor van jel, ha a spektrumban a relatív intenzitása nagyobb, mint 1%.



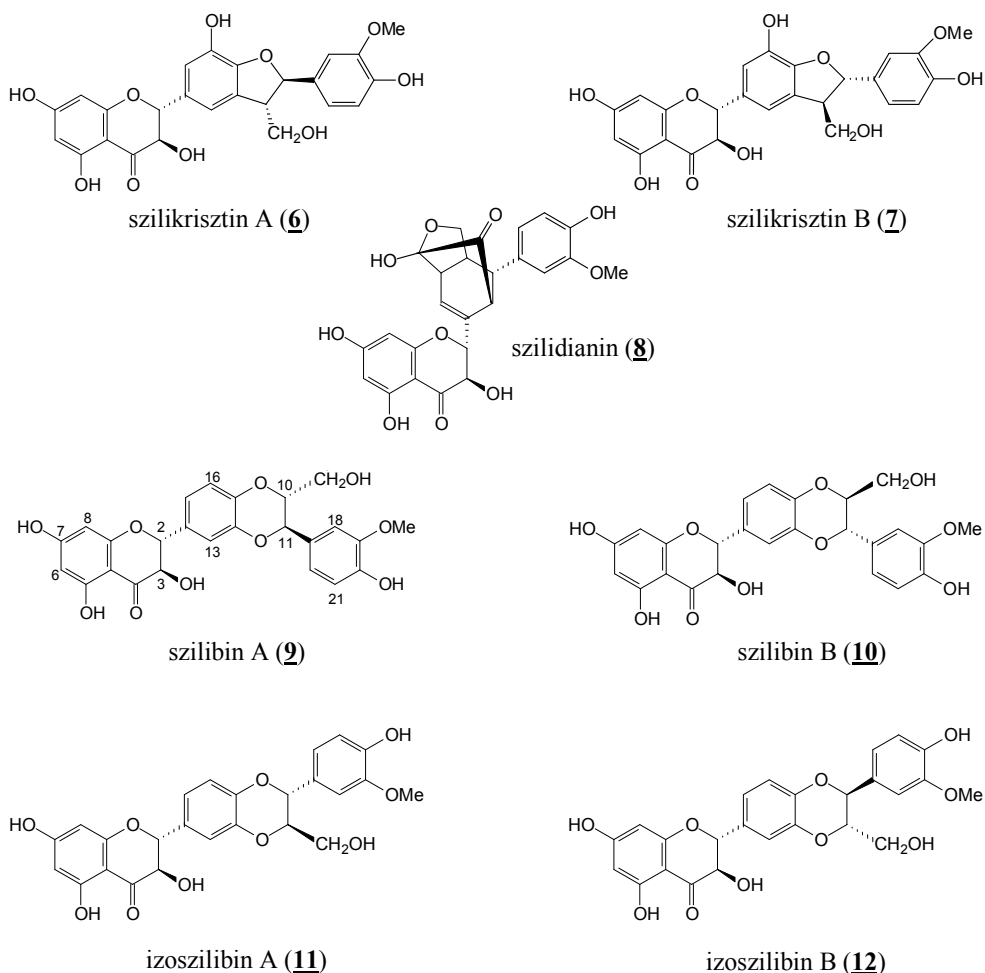
14. ábra

Kétdimenziós ábra, amely az ütközési energia és a tömeg/töltés függvényében mutatja a buprenorfin prekursorion (468,311 m/z) MS/MS spektrumában jelen lévő 20 legintenzívebb fragmenciót

A 14. ábra kiemeli az analitikai szempontból fontos ionokat, és azt is megtudhatjuk, hogy az adott ionok milyen ütközési energiánál jelennek meg, és milyen energiánál tűnnek el a spektrumból. Másrészt azt is leolvashatjuk az ábráról, hogy adott ütközési energiánál milyen főbb fragmensek vannak jelen az MS/MS spektrumban. Ezek az információk segíthetnek a vegyület ujjenyomatszerű azonosításában is.

5.2. A szilimarín MS/MS vizsgálata

A máriatövis extraktumában található 7 fő komponens szerkezeti képlete a 15. ábrán látható.



15. ábra

A Silybum marianum extraktumában (szilimarínban) lévő fő komponensek szerkezete.

Kutatócsoportunkban korábban HPLC-MS/MS módszert dolgoztunk ki a máriatövisből kinyert szilimarín keverék komponenseinek elválasztására és jellemzésére.⁷⁹ Sikerült elválasztani 11 komponenst, melyből 10-et azonosítottunk. Azt tapasztaltuk, hogy a szilibinek, izoszilibinek és szilikrisztinek

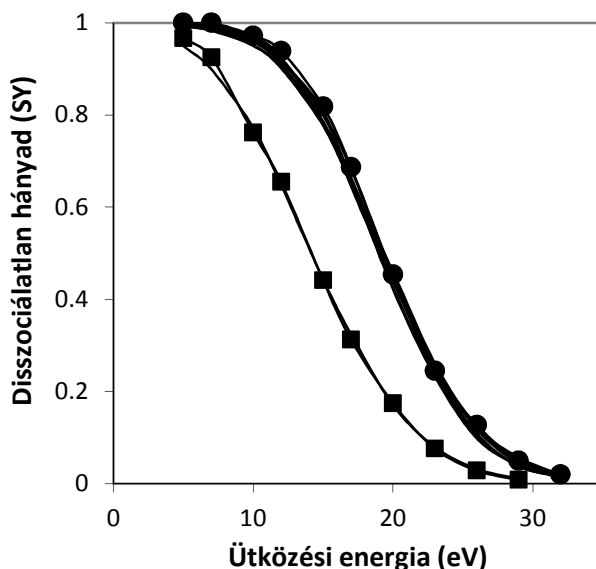
2,3-cisz izomerei teljesen azonos módon fragmentálódtak, mint a 2,3 transz izomerek,⁷⁹ ezért a fragmentáció energiaszükségletét csak a keverékben nagyobb mennyiségben jelen lévő transz-izomerek esetén mutatjuk be.

Az 15. ábrán szereplő mind a 7 vegyület összegképlete megegyezik ($C_{25}H_{22}O_{10}$), molekulatömegük 482 g/mol. Elektroporlasztásos ionizációval, negatív módban, egyszeres deprotonált anionná alakulnak $[M-H]^-$ (481 m/z). Így MS/MS mérésnél a 481 m/z-t prekursorionként kiválasztva, az MS/MS spektrumban nemcsak egyetlen vegyületből keletkező fragmensionokat, hanem mind a 7 vegyületből keletkező fragmensionok megjelennek. Ahhoz, hogy a keverékben lévő komponensek fragmentációs tulajdonságait külön-külön vizsgálni tudjuk, elválasztástechnikával kapcsolt MS/MS alkalmazására volt szükség. Kutatásaink során a szilikrisztin A (**6**), szilikrisztin B (**8**), szilidianin (**7**), szilibin A (**9**), szilibin B (**10**), izoszilibin A (**11**) és izoszilibin B (**12**) vegyületek fragmentációjának energiaszükségletét vizsgáltuk HPLC-MS/MS technikával.

5.2.1. A fragmentáció energiaszükséglete

A fragmentáció mértéke jól jellemezhető az úgy nevezett disszociálatlan hányad (SY) értékkel,^{10,11,12} Kis ütközési energiánál a SY értéke 1-hez közeli, hiszen a spektrumban csak a prekursorion van jelen, és a fragmentáció még nem kezdődött meg. Az ütközési energiát növelve először a kisebb aktiválási energiát igénylő elsődleges fragmentációs reakciók indulnak be. Még nagyobb energiánál a prekursorion intenzitása csökken, és a fragmensionok intenzitása nő, az SY értéke 0-hoz tart.

Minden vizsgált vegyület esetén felvettük az MS/MS spektrumokat különböző ütközési energiáknál, és meghatároztunk a SY értékeket. A szilimarín komponensek disszociálatlan hányadának ütközési energia függését (SY görbe) a 16. ábrán mutatjuk be.



16. ábra

A szilimaritin 7 fő komponensének SY görbéje (disszociálatlan hányad értéke az ütközési energia függvényében). A négyzettel jelölt görbék a szilikrisztin A, B (6, 8) prekursorionhoz tartoznak, a körrel jelölt görbék pedig a szilidianin (7), szilibin A, B (9, 10) és izoszilibin A, B (11, 12) prekursorionokhoz tartoznak.

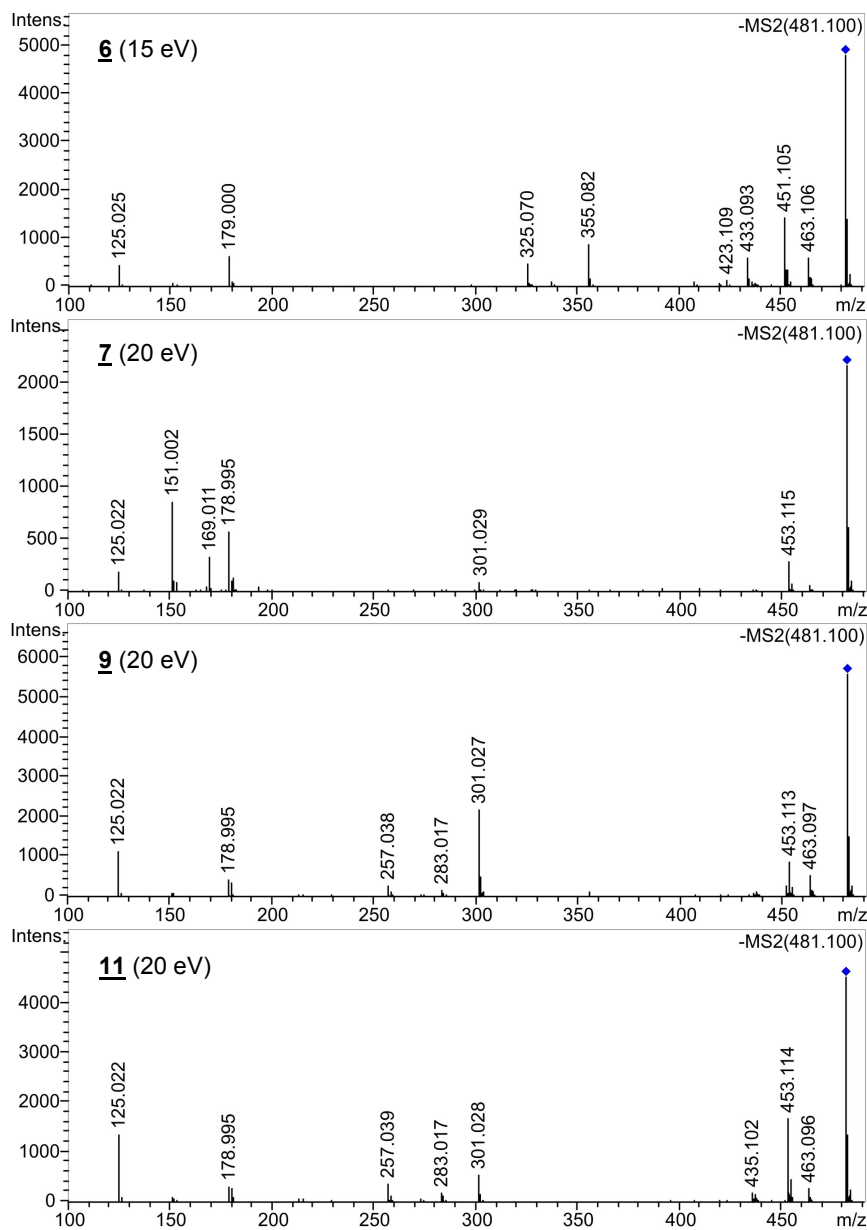
A 16. ábrán látható, hogy a vártak megfelelően a SY görbék alakja szigmoid. A szilidianin (7), a szilibin A, B (9, 10) és az izoszilibin A, B (11, 12) SY görbéje teljesen egybeesik, ami azt jelenti, hogy ugyanannál az ütközési energiánál indul a prekursorionok fragmentációja, míg a szilikrisztin A, B (6, 8) görbéje 5 eV-tal kisebb energia felé tolódik el. Meghatároztuk azt a karakterisztikus ütközési energiát (CE_{50}), amelynél a prekursorion intenzitása megegyezik a keletkezett fragmensionok intenzitásával (a disszociálatlan hányad értéke ekkor 0,5). A CE_{50} értékeket az SY görbéből 2 pontos interpolációval kaptuk.¹³ Az eredményeket az 3. táblázatban gyűjtöttük össze.

3. táblázat *A szilimarin komponensekre jellemző CE₅₀ ütközési energia értékek.*

	Komponens neve	CE ₅₀ (eV)
<u>6</u>	szilikrisztin A	14,2
<u>7</u>	szilidianin	19,4
<u>8</u>	szilikrisztin B	14,2
<u>9</u>	szilibin A	19,4
<u>10</u>	szilibin B	19,0
<u>11</u>	izoszilibin A	19,2
<u>12</u>	izoszilibin B	19,4

A vizsgált komponensek MS/MS spektrumait nem egy adott ütközési energiánál érdemes összehasonlítani, hanem az egyes komponensekhez tartozó CE₅₀ energiaértéknél, hiszen ekkor lesz hasonló mértékű a fragmentáció. Nemcsak a különböző vegyületek fragmentációját, hanem a különböző készüléken felvett MS/MS spektrumokat is célszerű az adott készüléken mért CE₅₀ ütközési energiaértéknél összevetni, vagy olyan ütközési energiánál, ahol azonos mértékű a fragmentáció. A szilikrisztin A (**6**), szilidianin (**7**), szilibin A (**9**) és izoszilibin A (**11**) vegyületek CE₅₀-nél felvett MS/MS spektruma látható a 17. ábrán. Kutatócsoportunk korábban megállapította, hogy a két szilikrisztin diasztereomer (**6**, **8**), a két szilibin diasztereomer (**9**, **10**) és a két izoszilibin diasztereomer (**11**, **12**) MS/MS spektruma megegyezik,⁷⁹ ezért csak 4 spektrumot mutatunk be a 7 komponensre.

A szilimarin komponensekhez tartozó CE₅₀ 14-20 eV közé esik. Ennél az alacsony ütközési energiánál az elsődleges fragmentáció során keletkező ionok figyelhetőek meg. Ahogy az a 17. ábrán látható, a legintenzívebb fragmentum minden szilimarin komponensnél különböző. A szilikrisztinekből (**6**, **8**) a 451 m/z ion, a szilidianinból (**7**) a 151 m/z ion, a szilibinekből (**9**, **10**) a 301 m/z ion, az izoszilibinekből (**11**, **12**) pedig a 453 m/z ion keletkezik a legnagyobb intenzitással. A kis ütközési energiánál felvett tömegspektrumban tapasztalt eltérések lehetőséget adnak a szilimarin komponensek gyors azonosítására.⁷⁹

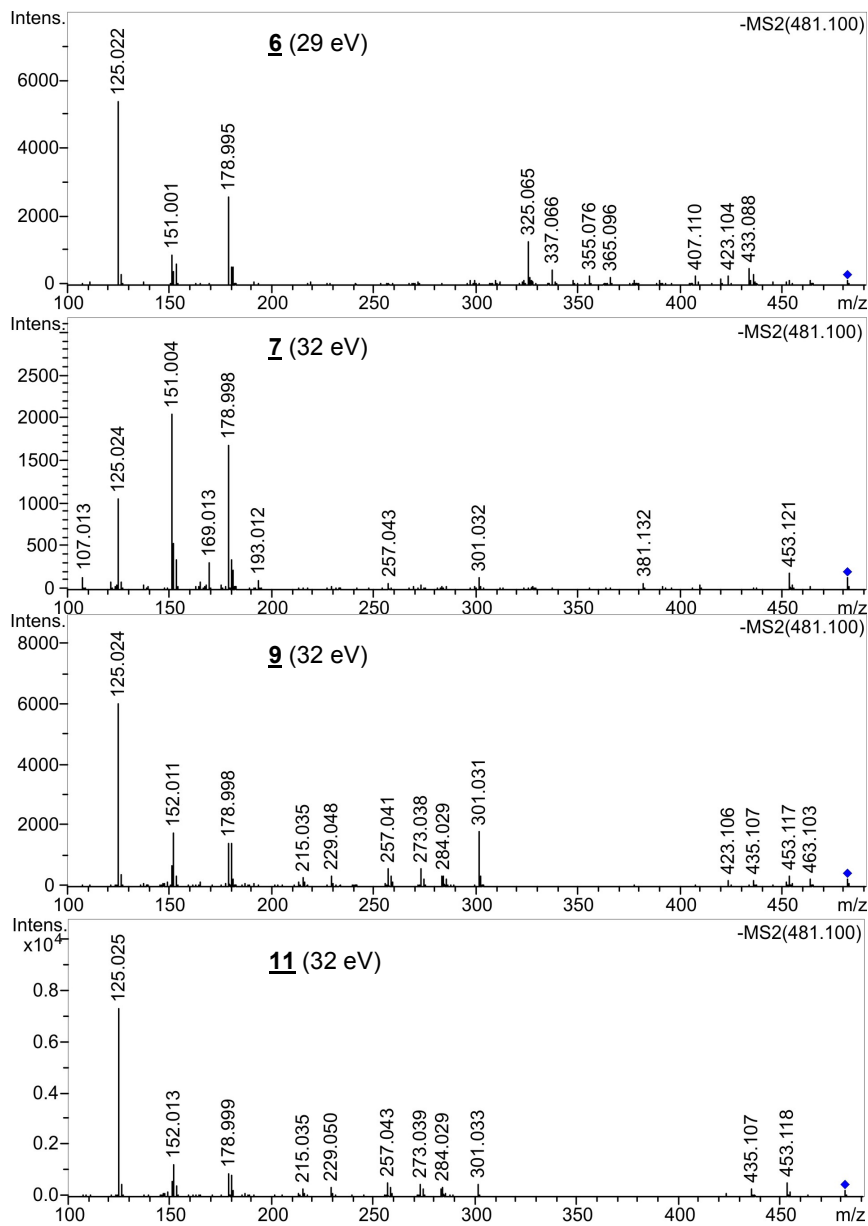


17. ábra

*Szilimarín komponenseinek MS/MS spektruma a prekursorion 50%-os fragmentációjánál (a komponensekre jellemző CE_{50} ütközési energiánál rögzítve): szilikrisztin A (**6**), szilidianin (**7**), szilibin A (**9**) and izoszilibin A (**11**).*

Ahogy azt már korábban is említettük, az ütközési energia növelésével egyre több fragmension jelenik meg az MS/MS spektrumban, így több szerkezeti információt nyerhetünk a prekursorionról. Az $SY \approx 0,01$ értékhez tartozó ütközési

energia a CE_{01} . Ennél az energiánál felvett MS/MS spektrumokat láthatjuk a 18. ábrán.

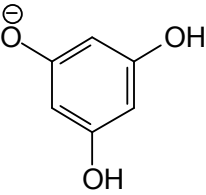
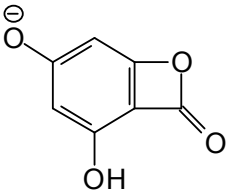
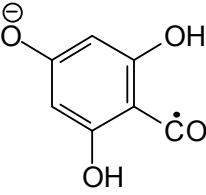
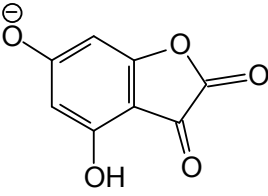
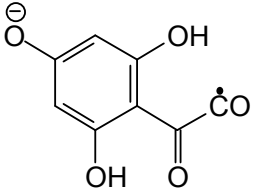
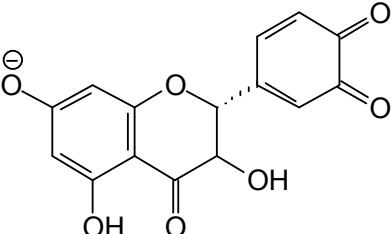


18. ábra

*Szilimarín komponenseinek MS/MS spektruma az 1%-os disszociálatlan hányadhoz tartozó ütközési energiánál (CE_{01}): szilikrisztin A (**6**), szilidianin (**7**), szilibin A (**9**) and izoszilibin A (**11**).*

Az MS/MS spektrumokban megjelenő fragmensionok szerkezetére találhatunk javaslatot az irodalomban. A 4. táblázatban foglaltuk össze a jelen értekezésben említett fragmensionok szerkezeti és összegképletét, valamint a hozzájuk tartozó elméleti és mért pontos tömeget főként Lee és munkatársai által javasoltak alapján.⁷³ Egyetlen fragmension szerkezetére adtunk eltérő javaslatot, a használt műszer eltérő pontosságából adódóan. Lee és munkatársai a szilikrisztinek, szilibinek és izoszilibinek esetén $C_{10}H_{11}O_3^-$ összegképletű szerkezetet javasoltak a 179 m/z ionra, míg a szilidianin esetében $C_8H_3O_5^-$ összegképletű szerkezetet az ugyanilyen nominális tömegű fragmensionra. A nagyfelbontású MS/MS mérések eredményei azonban azt mutatják, hogy ez a fragmension minden szilimarin komponens esetén megegyezik, a helyes szerkezet pedig a szilidianin fragmension szerkezete, melynek pontos tömege 178.997 és az összegképlete $C_8H_3O_5^-$ (4. táblázat).

4. táblázat Az értekezésben említett fragmensionok feltételezett szerkezeti és összegképlete valamint a hozzájuk tartozó mért és elméleti m/z értékek.

Mért (elméleti) m/z	Prekurzorion	Összegképlet	Javasolt szerkezeti képlet
125.024 (125.024)	szilibinek izoszilibinek szilikrisztinek szilidianin	$C_6H_5O_3$	
151.002 (151.004)	szilibinek izoszilibinek szilikrisztinek szilidianin	$C_7H_3O_4$	
152.012 (152.012)	szilibinek izoszilibinek	$C_7H_4O_4$	
178.997 (178.999)	szilibinek izoszilibinek szilikrisztinek szilidianin	$C_8H_3O_5$	
180.003 (180.006)	szilibinek izoszilibinek	$C_8H_4O_5$	
301.030 (301.035)	szilibinek izoszilibinek	$C_{15}H_9O_7$	

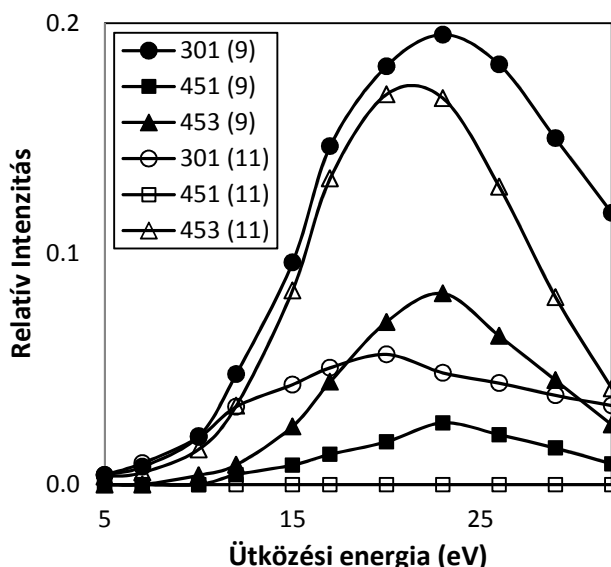
355.079 (355.082)	szilikrisztinek	$C_{19}H_{15}O_7$	
433.090 (433.093)	szilikrisztinek	$C_{24}H_{17}O_8$	
451.101 (451.103)	szilibinek	$C_{24}H_{19}O_9$	
451.105 (451.103)	szilikrisztinek	$C_{24}H_{19}O_9$	
453.116 (453.119)	szilibinek izoszilibinek szilikrisztinek szilidianin	$C_{24}H_{21}O_9$	
463.101 (463.103)	szilibinek izoszilibinek szilikrisztinek szilidianin	$C_{25}H_{19}O_9$	

5.2.2. A szilibinek és az izoszilibinek eltérő fragmentációjának értelmezése

A szilimarín komponensek fragmentációjakor nagyon sok hasonlóságot tapasztalhatunk, hiszen rokonvegyületekről van szó, és a kisebb szerkezeti eltérésekből adódó különbségek is jól megfigyelhetők. Például a szilidianin (**7**) MS/MS spektrumában a legintenzívebb fragmensionok 151 m/z-nél és 179 m/z-nél láthatók 5-32 eV ütközési energiánál, addig a szilibinek (**9**, **10**) esetében a legintenzívebb ionok a 125 m/z és 301 m/z értéknél megjelenő ionok. Ez a különbség a prekursorionok szerkezetének különbségéből és a fragmensionok feltételezett szerkezetéből egyértelműen adódik.

Meglepő azonban, hogy a szilibinek (**9**, **10**) és izoszilibinek (**11**, **12**) fragmentációjakor keletkező ionok intenzitása is eltérő annak ellenére, hogy a vegyületek szerkezete nagyon hasonló. A 301 m/z fragmension a szilibinek spektrumában, míg a 453 m/z fragmens az izoszilibinek spektrumában nagyobb intenzitású. Az utóbbi 453 m/z fragmension úgy keletkezik, hogy a C(4) atom és a rajta lévő oxocsoport CO-ként távozik. A szilibinek és az izoszilibinek szerkezete között az a különbség, hogy a C(10) és C(11) atomokon lévő szubsztituensek fel vannak cserélve, bár ezek az atomok a legstabilabb konformációban elég messze vannak a C(4) atomtól, így ez a szerkezeti különbség nem magyarázza a fragmentációban tapasztalt eltérést. Nemcsak a 301 és 453 m/z fragmensionok intenzitásában van különbség, hanem azt is tapasztaltuk, hogy a 451 m/z fragmension a izoszilibinek MS/MS spektrumában meg sem jelenik. Az irodalomban ezekre az eltérésekre csak egyszerű magyarázatokat találhatunk, például, hogy a 4-hidroxi-3-metoxi-fenil molekularesz szterikusan gátolt.⁷³

Ahhoz, hogy a tapasztalt hasonlóságokat és különbségeket értelmezni tudjuk, megvizsgáltuk a megjelenő fragmensionok letörési görbáját, vagyis egy adott fragmension intenzitásának változását az ütközési energia függvényében. A szilibinek és az izoszilibinek fragmentációjakor keletkező eltérő intenzitású 301, 451 és 453 m/z fragmensionok letörési görbéit hasonlíthatjuk össze az 19. ábrán. Az y-tengelyen ábrázolt relatív intenzitás az adott ütközési energiánál felvett MS/MS spektrumban mutatja a fragmension arányát az összes megjelenő ionhoz viszonyítva, beleértve a prekursoriont is.



19. ábra

A 301, 451 és 453 m/z fragmensionok letörési görbéi a szilibin A (**9**) (teli pontok) és az izoszilibin A (**11**) (üres pontok) esetében.

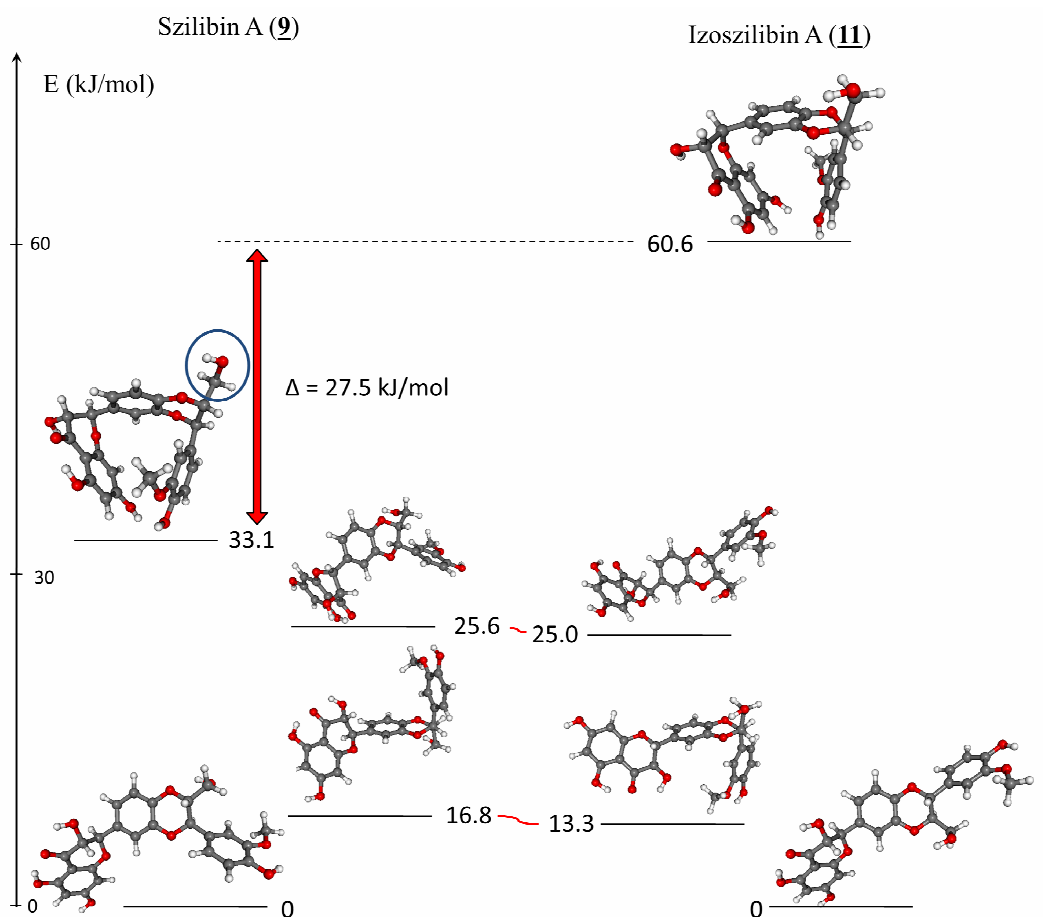
Feltételezésünk szerint az eltérő fragmentációs viselkedés annak köszönhető, hogy a szilibinek és izoszilibinek egyes konformerei eltérő stabilitásúak. Ennek igazolására molekulamechanikai számításokat végeztünk. MMFF (Merck Molecular Force Field) konformációs analízisnek vetettük alá a szilibin A (**9**) és az izoszilibin A (**11**) vegyületeket Macromodel 9.7.211 szoftver¹¹⁴ segítségével. A megengedett energiaváltozás 84 kJ/mol volt és a számítások vákuumra vonatkoztak. A szilibin A vegyületre 2493 az izoszilibin A vegyületre 2349 lehetséges konformert kaptunk a megadott energiaszinten belül. A kapott konformereket klaszterekbe rendeztük aszerint, hogy a C és a D gyűrű milyen konformációs helyzetben van. Mivel az eredmények az atommagok koordinátáit tartalmzták, a különböző konformációkat úgy klasztereztük, hogy a gyűrű konformerek megfelelő szubsztituenseinek a távolságát vizsgáltuk. Eredményképpen 4 csoportra lehetett osztani a több mint 2000 konformert. A C és a D gyűrű minden esetben csavartkád konformációjú, a rajtuk lévő szubsztituensek helyzete diekvatoriális vagy diaxiális lehet. Ennek megfelelően a legstabilabb konformereket tartalmazó első csoportba azok a konformerek kerültek, ahol a szubsztituensek mindkét gyűrűn diekvatoriálisan helyezkednek el. Másik két csoportba különülnek el azok a térszerkezetek, ahol az egyik gyűrűn a szubsztituensek diaxiálisak a másikon pedig diekvatoriálisak.

Az utolsó csoportban, ahol mindkét gyűrűn diaxiális helyzetűek a szubsztituensek 18-18 konformer található a szilibin A (**9**) és az izoszilibin A (**11**) vegyületek esetében is. Az utóbbi térszerkezeteket B3LYP/6-31G (d) szinten is optimáltuk Gaussian 09 szoftvercsomag segítségével.¹¹⁵ A 4 csoport legstabilabb konformereinek relatív B3LYP energiáit az 5. táblázatban láthatjuk.

5. táblázat A szilibin A (**9**) és az izoszilibin A (**11**) legstabilabb konformereihez tartozó relatív B3LYP energiák.

C gyűrű	D gyűrű	E (kJ/mol) szilibin A (9)	E (kJ/mol) izoszilibin A (11)
diekvatoriális	diekvatoriális	0,0	0,0
diekvatoriális	diaxiális	16,8	13,3
diaxiális	diekvatoriális	25,6	25,0
diaxiális	diaxiális	33,1	60,6

A 5. táblázatban látható, hogy a legstabilabb dupla diekvatoriális konformációhoz viszonyítva a D gyűrű átfordulásához ~15 kJ/mol energia szükséges mindkét vegyület esetén. A C gyűrűn lévő szubsztituensek diaxiális térállása kb. 25 kJ/mol-lal nagyobb energiájú a szilibin A és az izoszilibin A esetén is. Azonban a dupla diaxiális konformerhez tartozó energiaszintek jelentősen eltérnek a szilibin A (33,1 kJ/mol) és az izoszilibin A (60,6 kJ/mol) vegyületeknél. A 20. ábrán mutatjuk be ezen konformerek háromdimenziós térszerkezetét, amelyek megjelenítéséhez MOLEKEL szoftvert használtunk.¹¹⁶



20. ábra

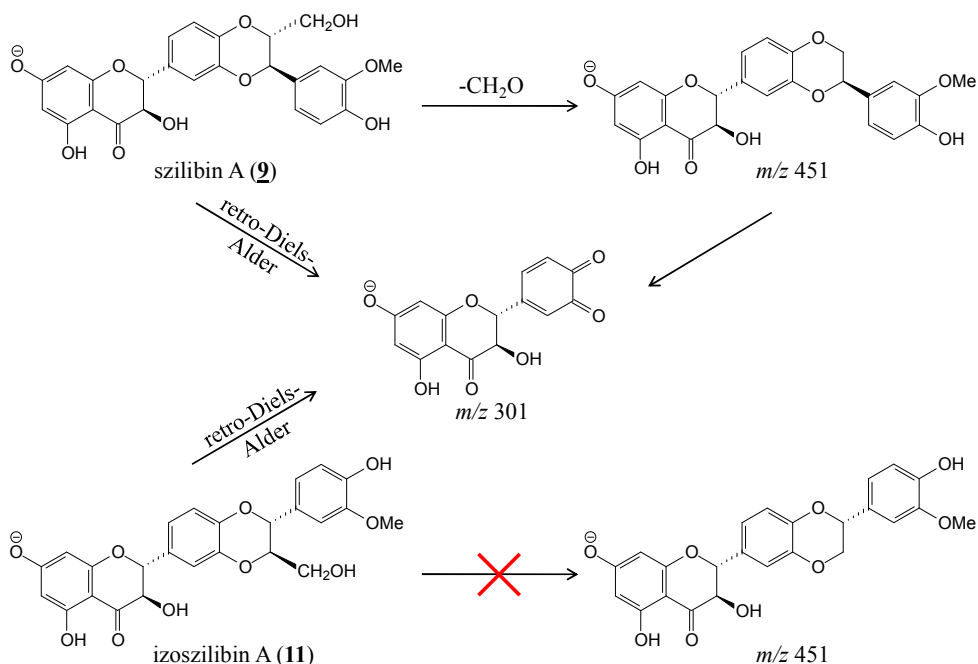
*A szilibin A (**9**) és az izoszilibin A (**11**) legstabilabb konformereinek 3 dimenziós térszerkezete a hozzájuk tartozó energiaszintekkel.*

Amikor a szilibin A vegyület C és D gyűrűjén is diaxiális térállásúak a szubsztituensek, akkor a vegyület összehajlik. Az E gyűrű közel kerül a kromanon részhez és újabb hidrogénkötések kialakulására lesz lehetőség, például a C(7)–OH és a C(20)–OH csoportok között, amelyek stabilizálhatják ezt a konformációt. Az izoszilibin eltérő konstitúciója miatt ezek az atomcsoportok nincsenek elég közel egymáshoz, hogy elég erős másodlagos kötések alakulhassanak ki, így ez a konformer nagyobb energiájú, ami azt jelenti, hogy az izoszilibin A kisebb valószínűséggel veszi fel ezt a konformációt.

A szilibinek és az izoszilibinek legstabilabb (dupla diekvatoriális) konformációiban a C(10)–OH csoport hidrogénkötést alakíthat ki az O(9) oxigénnel, de a szilibinek dupla diaxiális konformerénél ez a hidroxil csoport kiáll

a molekulából (20. ábrán kék körrel kiemelve), ezért már kis energiánál (10 eV) lehasadhat közvetlenül a prekursorionról. A távozó csoport formaldehid (30,010 m/z) hasonlóan a szilikrisztinek (**6**, **8**) fragmentációjához. A keletkező fragmension 451,105 m/z-nél jelenik meg a szilibin A MS/MS spektrumban.

A 19. ábrán látható, hogy 10 eV-nál kisebb ütközési energiánál a 301 m/z fragmension letörési görbéje egybeesik a szilibin A (**9**) és az izoszilibin A (**11**) esetén, de 10 eV fölött (amikor a 451,105 m/z fragmension megjelenik a szilibin A-nál) a szilibin A prekursorionból nagyobb intenzitással keletkezik a 301 m/z fragmens. A megfigyelések alapján mechanizmust javasoltunk a 301 m/z fragmension képződésére, amit a 21. ábrán mutatunk be.



21. ábra

*A 301 m/z fragmension képződésére javasolt mechanizmus a szilibin A (**9**) és az izoszilibin A (**11**) prekursorionból.*

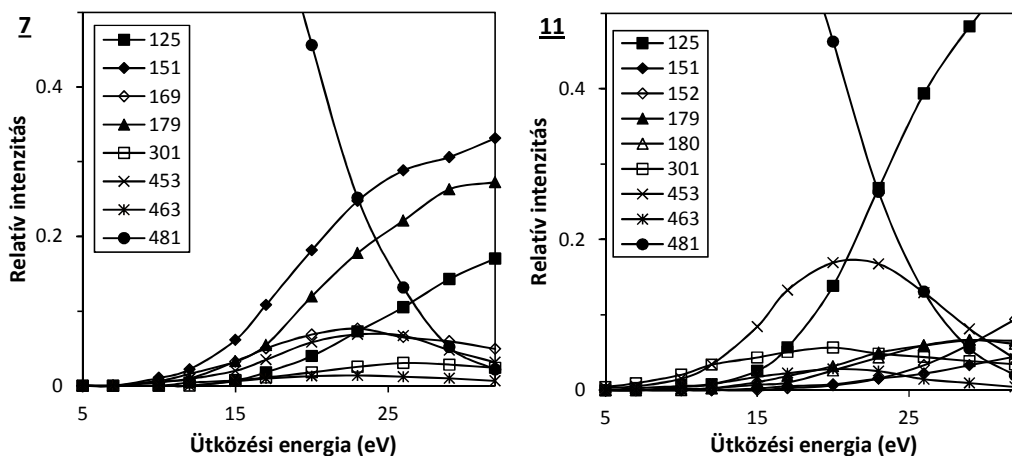
Úgy gondoljuk, hogy a di-keto fragmension (301 m/z) mind a szilibinek mind az izoszilibinek esetén ugyanazzal a mechanizmussal keletkezik, a két C–O kötés egyidejű felhasadásával, retro-Diels-Alder reakcióban (21. ábra). Azonban

10 eV fölött, a C(10)-ról történő formaldehid vesztés egy új reakcióutat nyit meg, aminek köszönhetően a 301 m/z fragmens képződése gyorsabb lesz a szilibin esetén, míg a további disszociációjának a sebessége nem változik. A 301 m/z fragmension így felhalmozódik, vagyis az intenzitása nagyobb lesz, mint az izoszilibinnél (19. ábra).

A konformációanalízis során kapott eredmény, miszerint a dupla diaxiális konformerek eltérő energiájúak, a 453 m/z fragmension intenzitásának különbsége is értelmezhető. A 20. ábrán látható, hogy a szilibin dupla diaxiális konformerében a C(4)=O lehasadása sztérikusan gátolt, és az oxigén atom még másodlagos hidrogénkötést is létesíthet, így ez a csoport kisebb valószínűséggel fragmentálódik.

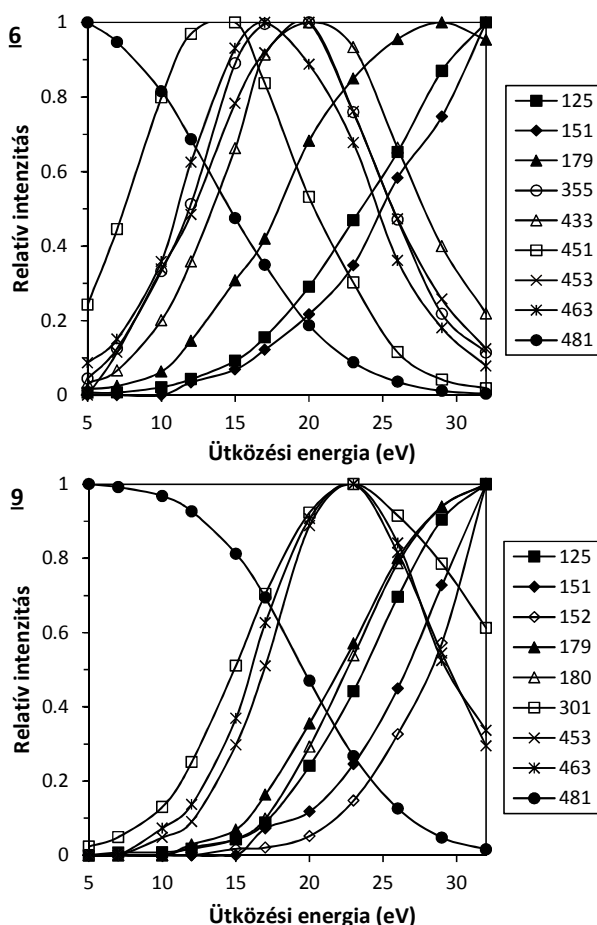
5.2.3. A fragmensionok intenzitásának energiafüggése

A 22. ábrán láthatóak a szilikrisztinek, a szilidianin, a szilibinek és az izoszilibinek főbb fragmensionjainak letörési görbéi.



22. ábra

A szilidianin (7) és az izoszilibin (11) prekursorionokból képződő fragmens ionok intenzitásának energiafüggése.



23. ábra

A szilikrisztin A (6) és a szilibin A (9) prekursorionokból képződő fragmens ionok normalizált letörési görbéi.

A normalizált görbék jobban szemléltetik a fragmensionok keletkezésének sorrendjét, mivel az intenzitás maximumokhoz tartozó ütközési energia könnyebben leolvasható. A szilibinek (9, 10) és az izoszilibinek (11, 12) fragmensionjai két csoportba oszthatóak a fragmensionok maximális intenzitásához tartozó energia alapján. A kezdeti bomlási reakciók során keletkező fragmensionok intenzitásának a maxima 23 eV körül van, a konsekutív reakciók során képző fragmensionoké pedig 32 eV körül (23. ábra). A szilikrisztin A (6) fragmensionjai nem követik ezt a trendet, a megjelenési energiák teljesen eltérnek.

A 453 és 463 m/z fragmensionok képződéséhez szükséges a legkisebb aktiválási energia, így ezek a bomlások kezdődnek meg a legkisebb ütközési

energiáknál. A prekursorionból CO vesztes során keletkezik a 453 m/z ion, víz eliminációjával pedig a 463 m/z ion. Más kis energiájú fragmensek a szilikrisztinek esetén a 451, 433 és 355 m/z-nél megjelenő ionok, a szilibinek és izoszilibinek esetén pedig a 301 m/z ion (23. ábra).

Ahogy növeljük az ütközési energiát (20-30 eV) újabb bomlási folyamatok indulnak meg, és a fragmensionok további disszociációja is bekövetkezik konszekutív reakciók során. Azon fragmensionok fragmentációja igényli a legnagyobb aktiválási energiát, amelyek a legnagyobb ütközési energiánál jelennek meg. Ezen ionok a szilikrisztin MS/MS spektrumában a 151 m/z ion, szilidianinnál a 125 m/z ion és a szilibinek/izoszilibinek esetén a 152 m/z ion.

Az egyes fragmensionok megjelenési energiája és egymáshoz viszonyított aránya segítséget nyújthat a szilimariban jelenlévő különböző flavanolignánok azonosításában.

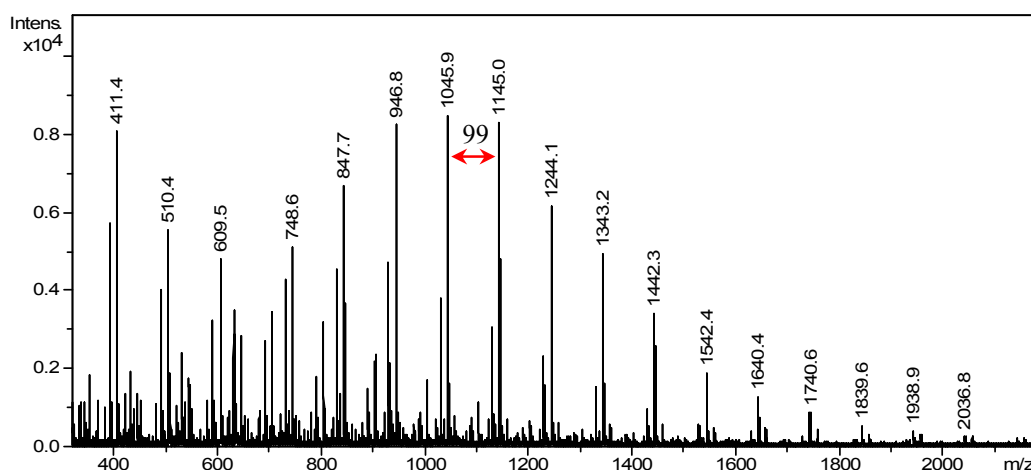
5.3. A poli-(2-etil-2-oxazolin) (pEtOx) MS/MS vizsgálata

5.3.1. Az előállított polimer jellemzése

A vizsgálandó poli-(2-etil-2-oxazolin) élő kationos polimerizációval állítható elő 2-etil-oxazolin monomerből kiindulva. A polimer jellemzésére többféle technikát is alkalmaztunk. Méretkizárásos kromatográfiával megállapítottuk a kapott polimer számátlag- és tömegátlag-molekulatömegét és molekulatömeg eloszlását, NMR mérések segítségével pedig a szerkezetről kaptunk információt. A ^1H -NMR spektrumban megjelenő csúcsokból az következik, hogy a metilén és metil H-ek aránya 6:3, ami megfelel a pEtOx polimer ismétlődő egységében lévő H-ek arányának, azonban a végcsoportokról nem kaptunk egyértelmű információt.

A tömegspektrometriai módszereknek köszönhetően nem csak a polimer polidiszperzitása, tömegátlag és számátlag molekulatömege határozható meg, hanem az egyes oligomerek pontos molekulatömege és eloszlása is. Az oligomerek csúcsa közötti távolság megadja az ismétlődő egység tömegét egyszeres töltésű sorozat esetén. Ennek ismeretében pedig a végcsoportok molekulatömege is meghatározható.

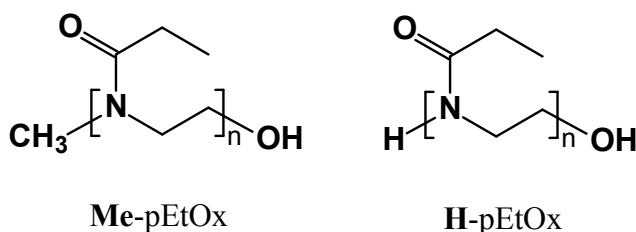
A pEtOx polimer MALDI-MS spektruma a 24. ábrán látható. A tömegspektrumban megjelenő egyszeres töltésű ionok jól szemléltetik a polimer molekulatömeg eloszlását.



24. ábra

A pEtOx polimer MALDI-TOF MS spektruma

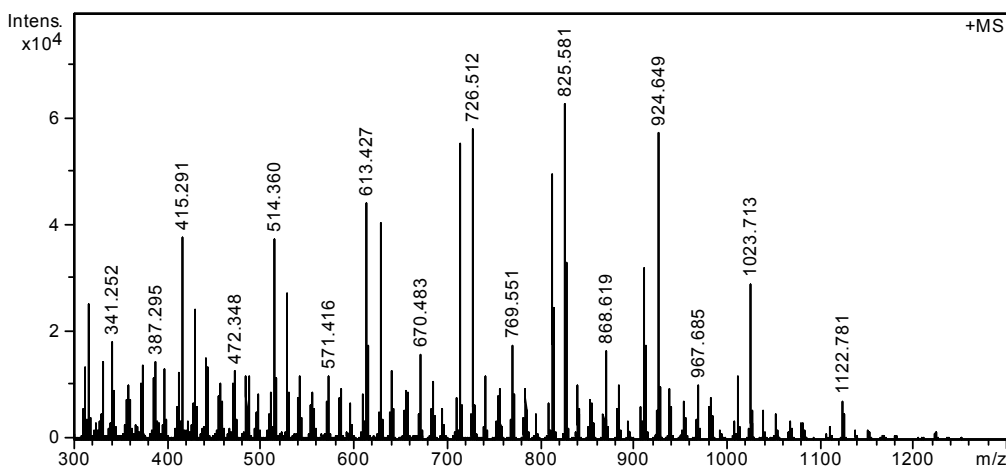
Az egyszeres töltésű csúcsok közötti távolság 99 m/z, ami megegyezik az ismétlődő egység (C_5H_9NO) tömegével. A spektrumban két sorozat is megfigyelhető, melyek végcsoportjai különböznek egymástól. Az előállított pEtOx szerkezetét a 25. ábra mutatja.



25. ábra

A pEtOx polimer szerkezete a különböző végcsoportokkal.

A pEtOx tömegspektrumát más ionizációs technikákkal is felvettük. Az APCI-MS spektrum látható a 26. ábrán. Az ionforrásban alkalmazott nagy hőmérséklet miatt a nagyobb tömegű oligomerek jelintenzitása kisebb, mivel azok részben fragmentálódtak.¹¹⁷

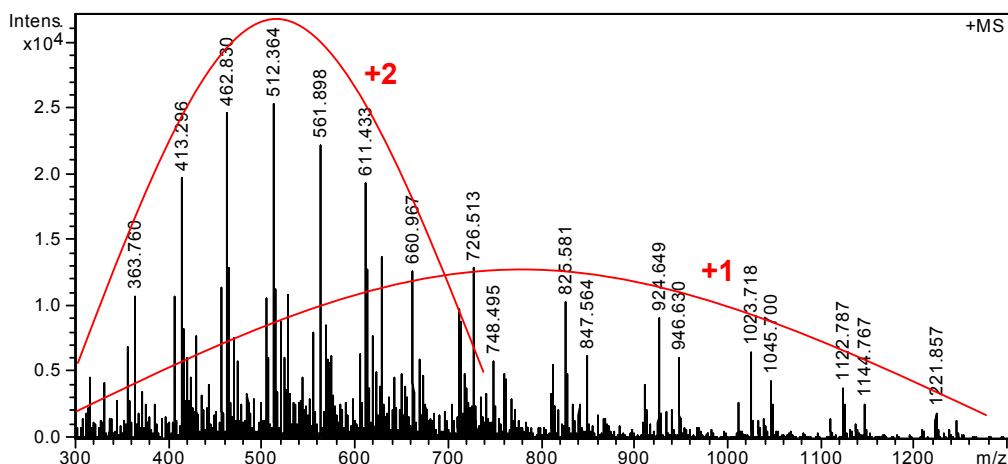


26. ábra

A pEtOx polimer APCI-Q-TOF MS spektruma.

Az ESI-MS spektrumban mindkét sorozat tagjai protonnal, ammóniumionnal vagy nátriumionnal ionizálva; egyszeres és kétszeres töltésű adduktként is megjelennek (27. ábra). Például a 825,6 m/z-nél megjelenő ion a

protonált 8 ismétlődő egységet tartalmazó **Me**-pEtOx oligomer csúcsa. Az oligomer molekulatömege ennek megfelelően 824,6 Da. Bár a protonált molekula a legintenzívebb, de ugyanez az oligomer nátriumionnal ionizálva is megjelenik 847,6 m/z-nél. A 811,6 m/z-nél megjelenő csúcs pedig a protonált **H**-pEtOx oligomerhez tartozik.

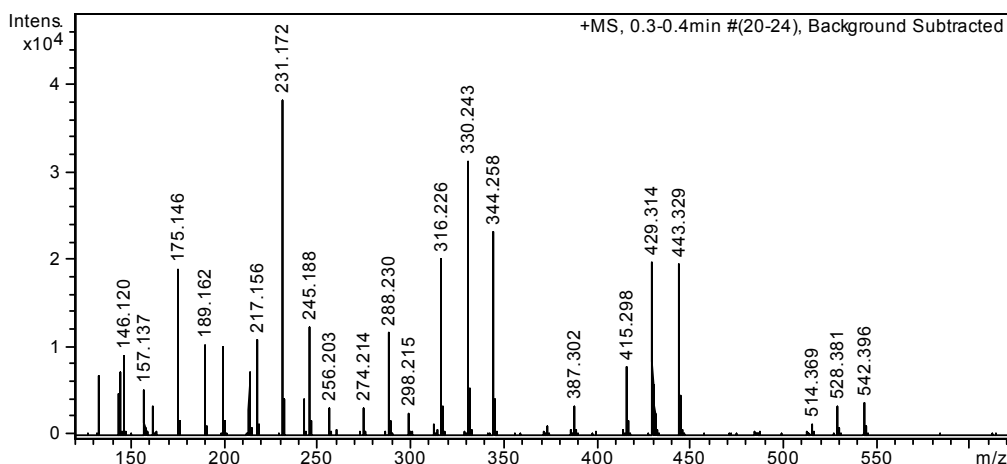


27. ábra

A pEtOx polimer ESI-Q-TOF MS spektruma.

Azért, hogy igazoljuk a különböző végcsoportú polimerek szerkezetét a polimert deuterált metanolban oldottuk, és felvettük az ESI-MS spektrumát. A **Me**-pEtOx tömege 2 egységgel, a **H**-pEtOx tömege 3 egységgel tolódott el. A javasolt szerkezet alapján a polimer 1 illetve 2 disszociálabilis protont tartalmaz. A deuterált polimer spektrumában tapasztalt 2, ill. 3 m/z eltolódás megegyezik a szerkezet alapján várt eltolódással, hiszen az ionizáció is deutériumionnal történik.

A DART (valós idejű közvetlen analízis) ionizációs módszerrel felvett spektrumban (28. ábra) egyszeres töltésű protonnal ionizált oligomerek láthatóak, és a technika sajátosságai miatt a nagyobb polimerizációs fokú oligomerek nem jelennek meg a tömegspektrumban.



28. ábra

A pEtOx polimer DART-Q-TOF MS spektuma.

Az említett technikákkal meghatároztuk a számátlag-molekulatömeg (M_n), tömegátlag-molekulatömeg (M_w) valamint polidiszperzitás (M_w/M_n) értékeket. A kapott eredményeket foglalja össze a 6. táblázat. Méretkiszorításos kromatográfiával a két különböző végcsoportú polimert nem lehetett elválasztani, így a meghatározott átlag-molekulatömeg a keverékre vonatkozik. A tömegspektrometriai módszerekkel azonban elválasztás nélkül meg lehetett határozni mindkét végcsoportú polimer vonatkozó adatokat külön-külön.

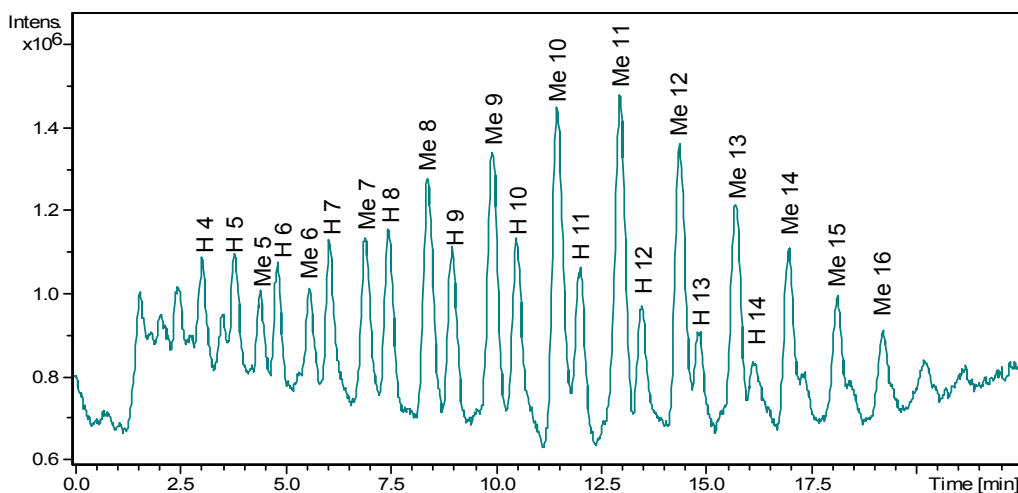
6. táblázat *Az előállított pEtOx polimer számátlag-molekulatömege (M_n), tömegátlag-molekulatömege (M_w) és polidiszperzitása (PDI, M_w/M_n).*

	Me-pEtOx			H-pEtOx		
	M_n	M_w	PDI	M_n	M_w	PDI
MALDI-MS	1030	1110	1,08	870	960	1,10
APCI-MS	750	800	1,07	650	710	1,09
ESI-MS	950	1030	1,08	820	920	1,12
SEC	1130	1190	1,05	-	-	-

A MALDI és ESI-MS spektrumból számolt M_n és M_w értékek jól egyeznek, de az APCI-MS spektrumból meghatározott értékek ezeknél kisebbek. Ez abból

adódik, hogy az APCI ionforrásban alkalmazott nagy hőmérsékleten a nagyobb tömegű oligomerek részben fragmentálódtak.¹¹⁷

Elvégeztük a polimer kromatográfiás elválasztását is. Fordított fázisú gradiens módszer segítségével metanol:víz eluenssel sikerült elválasztani egymástól a különböző lánchosszúságú és különböző végcsoportú oligomereket. A tömegspektrometriás detektálással kapott úgynevezett totálion kromatogram látható a 29. ábrán.



29. ábra

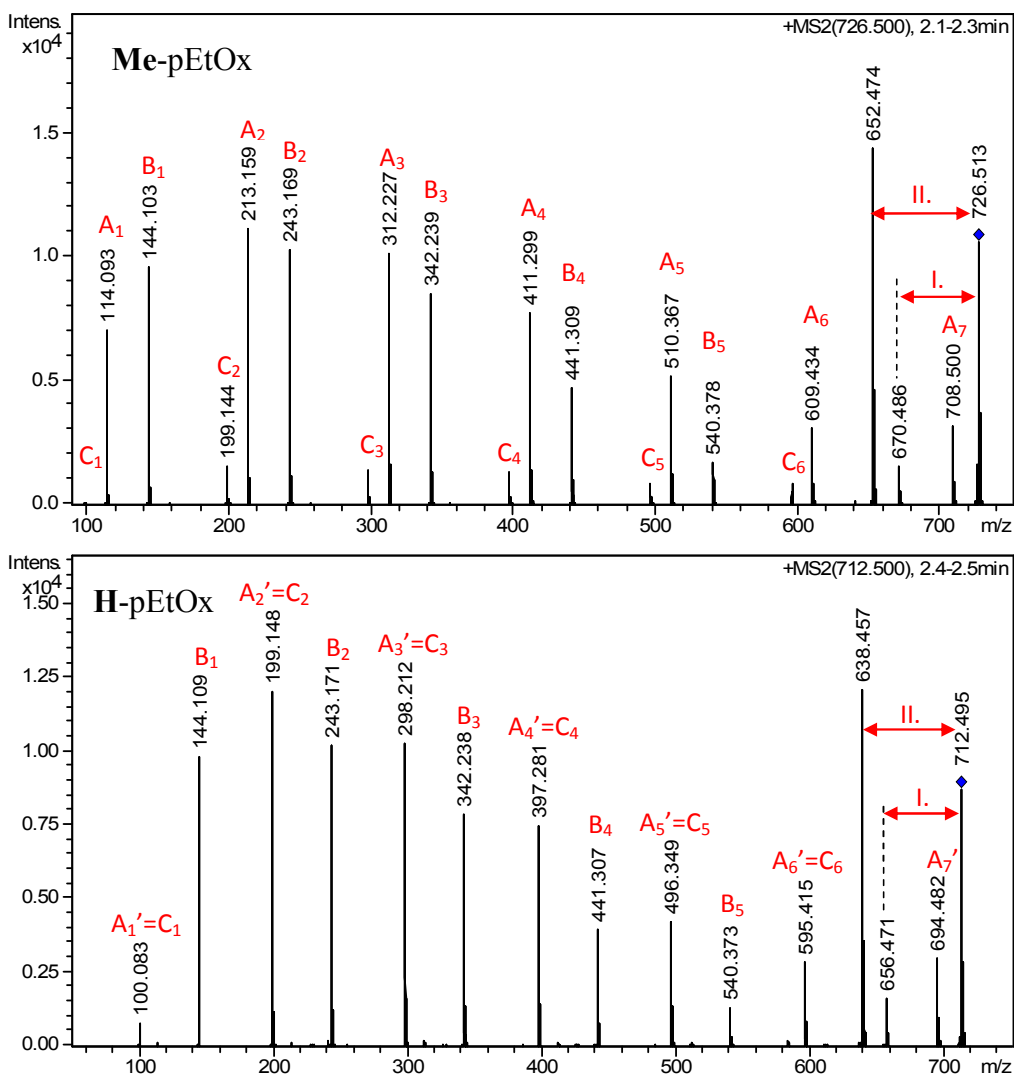
A pEtOx polimer LC-MS kromatogramja. A H és a Me a polimer végcsoportjára utal, a számok pedig az ismétlődő egységek számát jelentik.

5.3.2. A pEtOx polimer fragmentációja

A polimer fragmentációjának vizsgálatokor kiválasztottunk egy adott lánchosszúságú molekulát prekursorionként, és felvettük az MS/MS spektrumát. Mivel a polimer polidiszperz rendszer, előfordulhat, hogy a prekursorionként kiválasztott m/z értéknél több molekulához tartozó ion is megjelenik. Ezért rögzítettük az egyes oligomerekhez tartozó fragmentációs spektrumokat MS/MS és LC-MS/MS módszerrel is. Megállapítottuk, hogy nincs különbség a kapott spektrumok között, így a további vizsgálatokat elválasztástechnika nélkül végeztük.

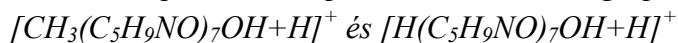
Megvizsgáltunk a pEtOx mintában jelenlévő különböző polimer sorozatok tagjainak fragmentációját többféle ionforrással és különböző ütközési energiával.

Megállapítottuk, hogy egy adott lánc hosszúságú pEtOx oligomer MS/MS spektrumában ugyanazon fragmensionok jelennek meg az ionizációs technikától függetlenül (ESI, APCI, DART). A 7 ismétlődő egységet tartalmazó **Me**-pEtOx és **H**-pEtOx polimerek pozitív ionmódban felvett APCI-MS/MS spektrumai láthatóak a 30. ábrán.



30. ábra

A **Me**-pEtOx és a **H**-pEtOx 7 ismétlődő egységet tartalmazó protonált tagjainak APCI-MS/MS spektruma. A prekursorionok összegképlete:



A **Me-pEtOx** polimer MS/MS spektrumában három fragmension sorozat jelenik meg (**A**, **B** és **C**). A prekursorionból továbbá két semleges molekula vesztes (I. és II.) látható a 30. ábrán, amelyekről később lesz szó. A fragmension sorozatok tagjai között 99 m/z különbség van, ami egy ismétlődő egység molekulatömegének felel meg. A **C** sorozat összegképlete a pontos tömeg alapján $[(C_5H_9NO)_n+H]^+$, vagyis pontosan az ismétlődő egységek többszöröse, azonban a végcsoportokat nem tartalmazza. Az **A** sorozat tömege 14,016 m/z-vel tér el a **C** sorozattól, ami CH_2 -nek felel meg. Az **A** sorozat összegképlete $[(C_5H_9NO)_nCH_3]^+$, vagyis az ismétlődő egységeken kívül a metil végcsoportot tartalmazza, azonban a hidroxil végcsoportot nem. A pontos tömeg alapján a **B** sorozat az ismétlődő egységeken felül C_2H_5O -t tartalmaz (45,026 m/z), összegképlete tehát $[(C_5H_9NO)_nC_2H_5O]^+$. A fragmension sorozatokra javasolt összegképletet, elméleti és mért m/z értékeket a 7. táblázatban láthatjuk.

7. táblázat *A Me-pEtOx polimer fragmentációjakor keletkező sorozatok összegképlete és a hozzájuk tartozó mért és számított m/z értékek.*

		n=2		
	általános összegképlet	összegképlet	mért m/z	elméleti m/z
A sorozat	$[(C_5H_9NO)_nCH_3]^+$	$[C_{11}H_{21}N_2O_2]^+$	213,159	213,160
B sorozat	$[(C_5H_9NO)_nC_2H_5O]^+$	$[C_{12}H_{23}N_2O_3]^+$	243,169	243,170
C sorozat	$[(C_5H_9NO)_nH]^+$	$[C_{10}H_{19}N_2O_2]^+$	199,144	199,144

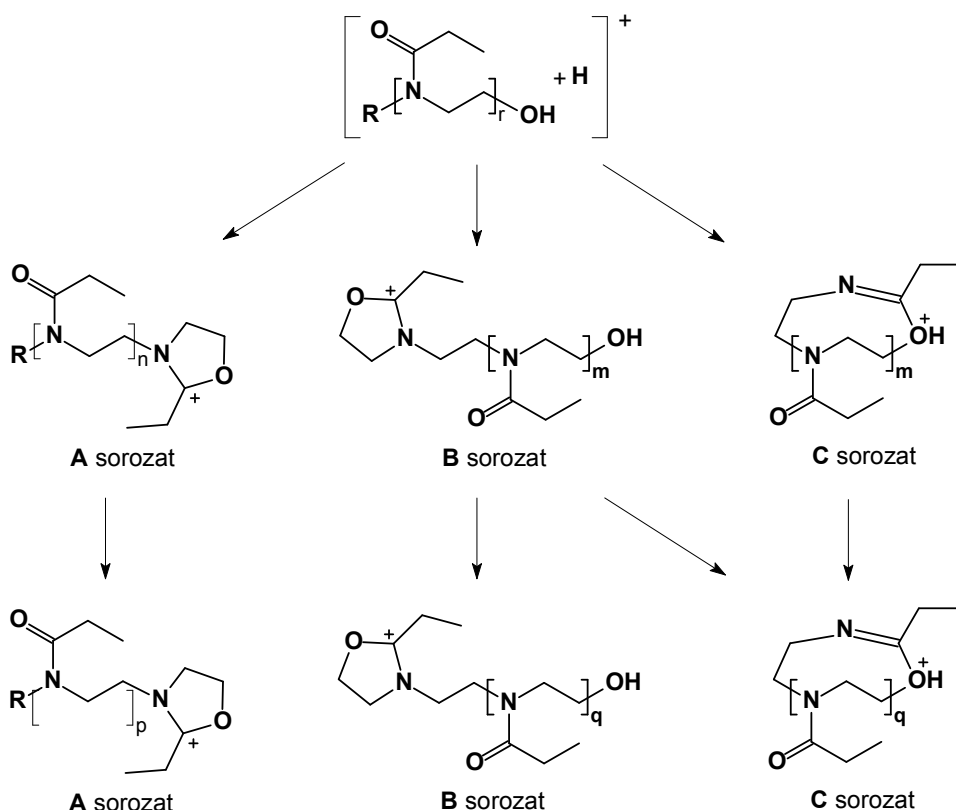
A **H-pEtOx** polimer MS/MS spektrumában csak 2 fragmension sorozat jelenik meg (30. ábra), melyek pontos molekulatömege megegyezik a Me-pEtOx-ból keletkező **B** és **C** sorozat pontos molekulatömegével. Ebből arra következtettünk, hogy a **B** és **C** sorozatok nem tartalmazzák a polimer egymástól különböző végcsoportját (H vagy Me). Az **A** sorozat azonban tartalmazza ezt a végcsoportot (**A'**), így a **H-pEtOx** esetében 14 m/z-vel el van tolódva és így molekulatömege átfed a **C** sorozat molekulatömegével.

A 30. ábrán látható két semleges molekulavesztés (I. és II.) a **H-pEtOx** esetében is megjelenik a prekursorionból. A pontos tömegek alapján a távozó semleges molekulák összegképlete C_3H_4O (I. 56,026 Da) és $C_3H_6O_2$ (II. 74,038 Da). A I. lehasadás az ismétlődő egység oldalláncának eliminációjával értelmezhető. A II. hasadás ($C_3H_6O_2$) elméletileg az oldallánc és egy vízmolekula

együttes eliminációjából is adódhatna, de ezt a fragmens ionok megjelenési energiája nem támasztja alá. A fragmentáció energiafüggését később részletezzük.

Az MS/MS spektrumban megjelenő fragmens sorozatok szerkezetét deuterált oldószerben végzett kísérletekkel igazoltuk. Ahogyan azt korábban is említettük, a **H**-pEtOx két disszociálabilis hidrogént is tartalmaz, mindkét végcsoporton egyet-egyet, a **Me**-pEtOx pedig csak egyet a hidroxil végcsoporton. Ezért az MS/MS spektrumban látható tömeg-eltolódásokból következtetni lehet a végcsoportok jelenlétére az egyes fragmensionokban. A deuterált **Me**-pEtOx MS/MS spektrumában a prekursorion tömege a várt 2 m/z egységgel tolódik el, a **B** és **C** sorozat tömege 1 m/z egységgel, az **A** sorozat tömege pedig nem változik. A deuterált **H**-pEtOx MS/MS spektrumában a prekursorion molekulatömege 3 egységgel több, mint a nem deuterálté, az **A'**=**C** és **B** fragmension sorozatok molekulatömegei pedig 1-1 egységgel tolódnak el. Az eredmények igazolták, hogy az **A**, **A'** sorozat tartalmazza a H vagy Me láncvéget, de a hidroxil láncvéget nem. Azt is megállapítottuk, hogy a **B** és **C** sorozat a H vagy Me láncvéget nem tartalmazza, de a hidroxil láncvéget igen.

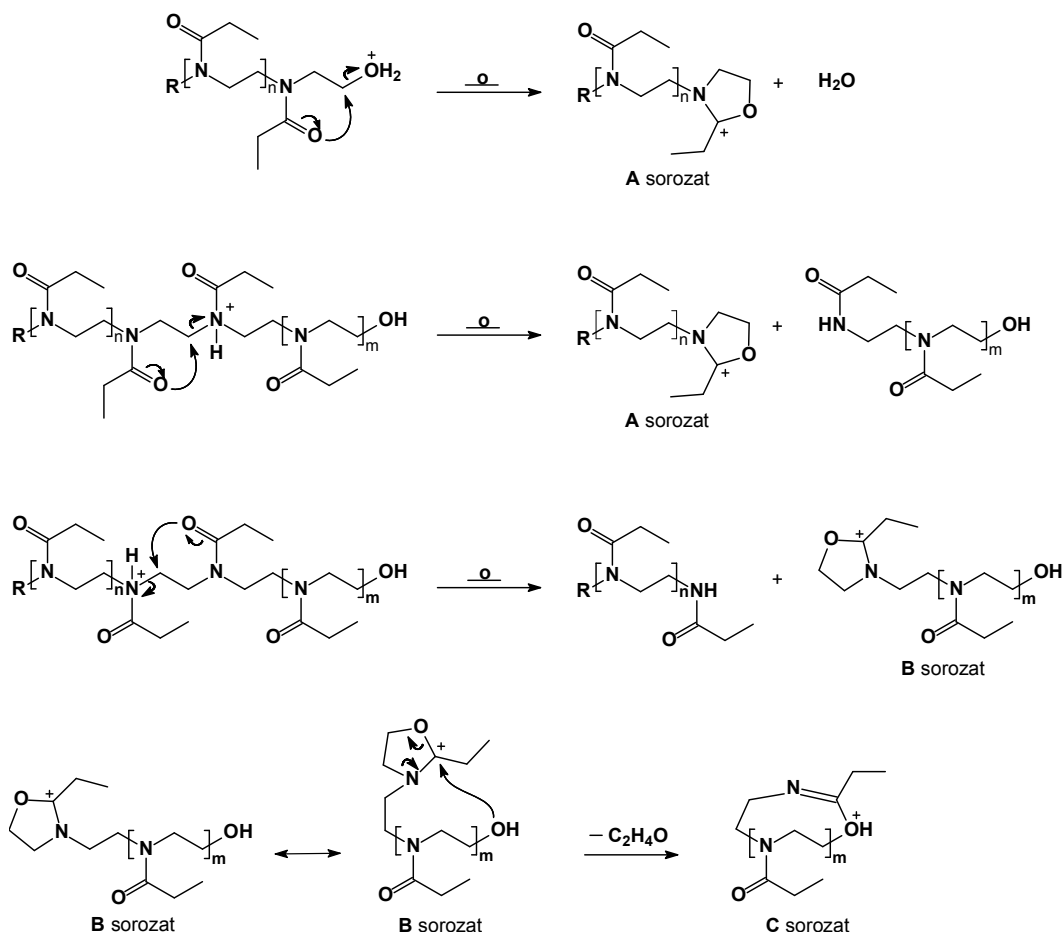
A polimer lánc fragmentációs mechanizmusának részletesebb megértéséért pszeudo MS³ vizsgálatokat végeztünk. A 30. ábrán látható fragmensionokat már az ionforrásban generáltuk, és vizsgáltuk a további disszociációjukat. Az **A** sorozat csak az **A** sorozat pszeudo MS³ spektrumában jelent meg, a **B** sorozat pedig csak a **B** sorozatból képződött. A **C** sorozat azonban megjelent a **C** sorozat és a **B** sorozat pszeudo MS³ spektrumában is. A tapasztalatokat a 31. ábra foglalja össze.



31. ábra

A pEtOx polimer fragmentációs sémája a pszeudo MS³ eredmények alapján.

Az eddigi eredmények alapján az **A**, **B** és **C** sorozatok képződésének feltételezett mechanizmusa a 32. ábrán látható. Ha a protonálódás a hidroxil oxigénen történik, akkor ez a végcsoport fragmentálódik víz kilépéssel (32. ábra 1. sor), és az **A** sorozat első tagját kapjuk termékionként. Ha a protonálódás a láncban lévő egyik nitrogénen történik, akkor a szomszédos szénatomokon lecsökken az elektronsűrűség, és a mellette lévő ismétlődő egység oxo csoportjának támadása az elektrofil C atomra indukálja a N–C kötés hasadását. Ez a kötés hasadás történhet a polimer mindkét vége felől, ami az **A** vagy a **B** sorozatot eredményezi (32. ábra 2-3.sor). A **C** sorozat a prekursorionból és a **B** sorozatból is képződik, tömege 44,026 m/z-vel kisebb, mint a **B** sorozat tömege, vagyis a távozó csoport összegképlete C₂H₄O. A deutériumos kísérletek alapján ez a csoport nem távozhat a hidroxil végcsoport felől, hiszen továbbra is tartalmaznia kell ezt a végcsoportot. A **C** sorozat javasolt képződési mechanizmusa és szerkezete a 32. ábra 4. sorában látható.

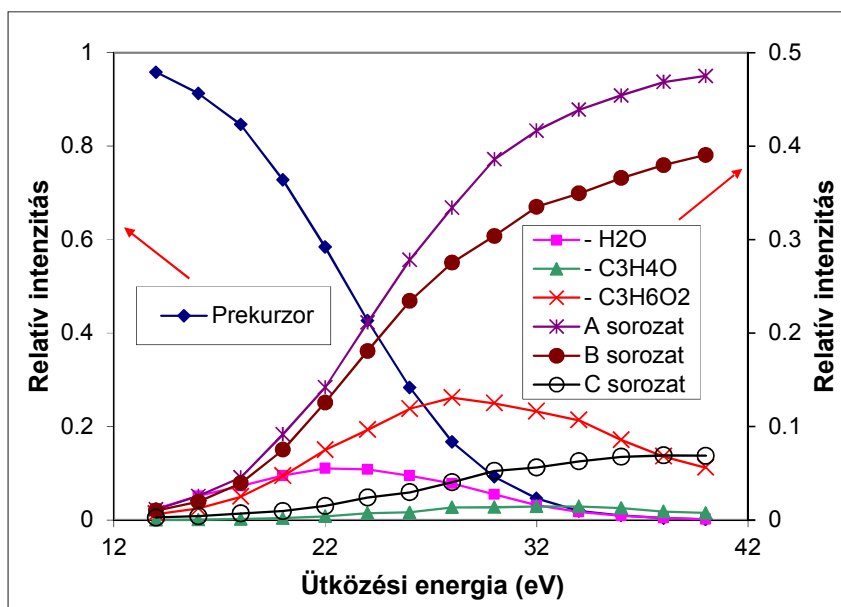


32. ábra

Az A, B és C termékion sorozatok képződésének feltételezett mechanizmusa.

5.3.3. A pEtOx polimer fragmentációjának energiafüggése

A polimerből képződő fragmensionok intenzitása függ az ütközési energiától. Kisebb ütközési energia hatására csak a kisebb aktiválási energiát igénylő kötés-hasadások mennek végbe. Ahogy növeljük az ütközési energiát, több kisebb tömegű fragmension jelenik meg. A 2-10 ismétlődő egységet tartalmazó **Me**-pEtOx és **H**-pEtOx polimerek fragmentációját tanulmányoztuk 4-58 eV ütközési energia tartományban. A **Me**-pEtOx polimerből képződő fragmensionok letörési görbéi láthatók a 33. ábrán.



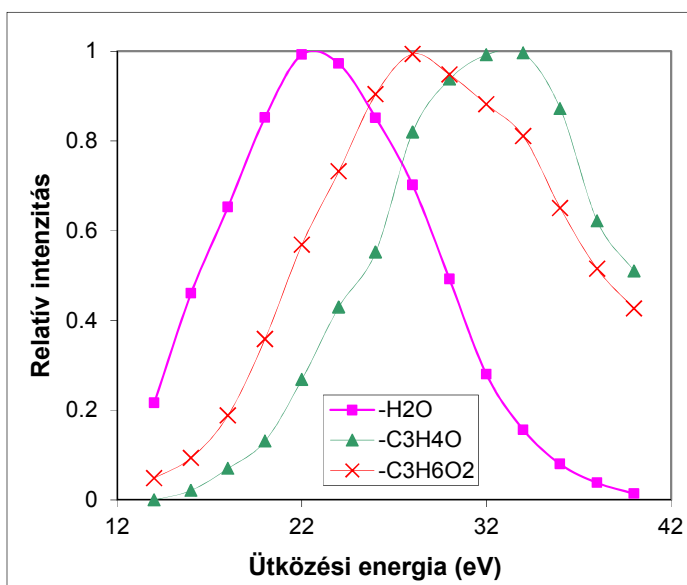
33. ábra

A 7 ismétlődő egységet tartalmazó Me-pEtOx oligomerból képződő fragmensionok letörési görbéi.

A Me-pEtOx esetén a víz eliminációjához szükséges a legkisebb ütközési energia, a C_3H_4O és $C_3H_6O_2$ molekulák disszociációja nagyobb energiát igényel. A polimer lánc hasadásához, vagyis a fragmension sorozatok képződéséhez szükséges a legnagyobb ütközési energia. Az már az MS/MS spektrumból is jól látható, hogy az **A** és **B** sorozatok intenzitása hasonló, míg a **C** sorozat intenzitása sokkal kisebb. Az **A** és **B** sorozathoz tartozó letörési görbe lefutása is megegyezik, ami arra utal, hogy a képződési mechanizmus is hasonló. Az eredmények alátámasztják a 32. ábrán javasolt fragmentációs mechanizmust, hiszen a protonált nitrogén mindkét oldalára ugyanolyan valószínűséggel történhet az oxo csoport támadása, így a keletkező fragmensionok intenzitásának aránya megközelítőleg 1:1. A javasolt mechanizmus alapján a **C** sorozat a **B** sorozatból keletkezik, ennek megfelelően nagyobb ütközési energiánál jelenik meg a spektrumban.

A C_3H_4O veszteség az ismétlődő egység oldalláncának lehasadásával értelmezhető (35. ábra 1. sor). A $C_3H_6O_2$ kilépés elméletileg az oldallánc és egy vízmolekula egymás utáni eliminációjából is adódhatna. A 34. ábrán látható normalizált letörési görbék azonban azt mutatják, hogy a $C_3H_6O_2$ lehasadásához kisebb energia szükséges (34. ábra, piros kereszt), mint az oldallánc

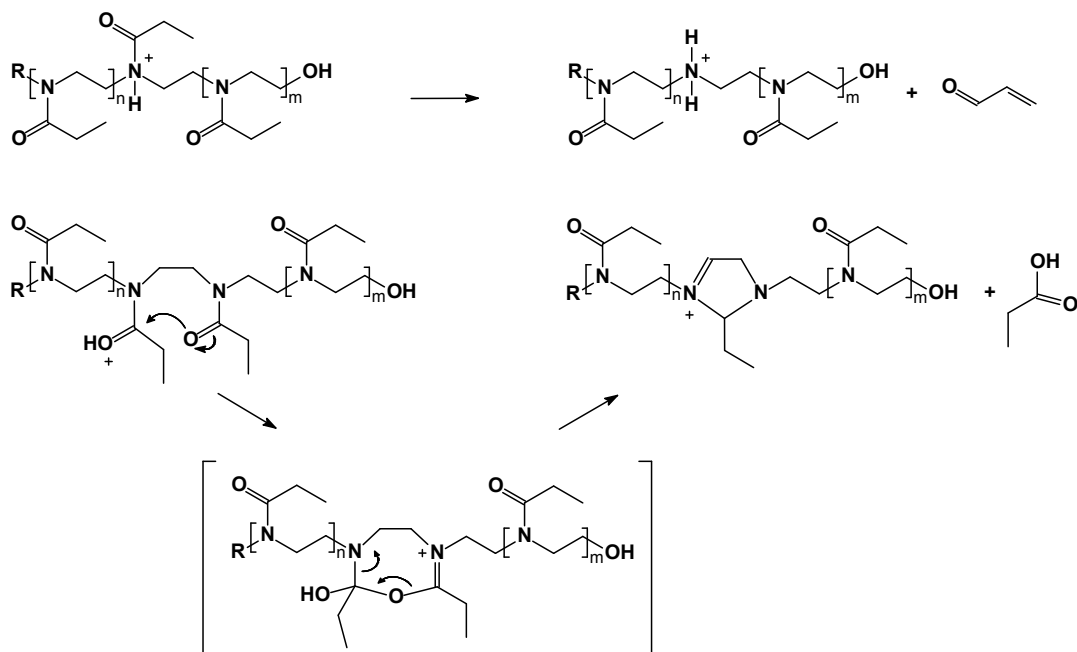
fragmentációjához (34. ábra, zöld háromszög). Tehát a $C_3H_6O_2$ lehasadása nem lehet a víz és az oldallánc konszekutív eliminációjának eredménye, hanem közvetlenül a prekursorionból történik egyetlen lépésben.



34. ábra

A 7 ismétlődő egységet tartalmazó pEtOx prekursorionból közvetlenül keletkező fragmensionok normalizált letörési görbéje.

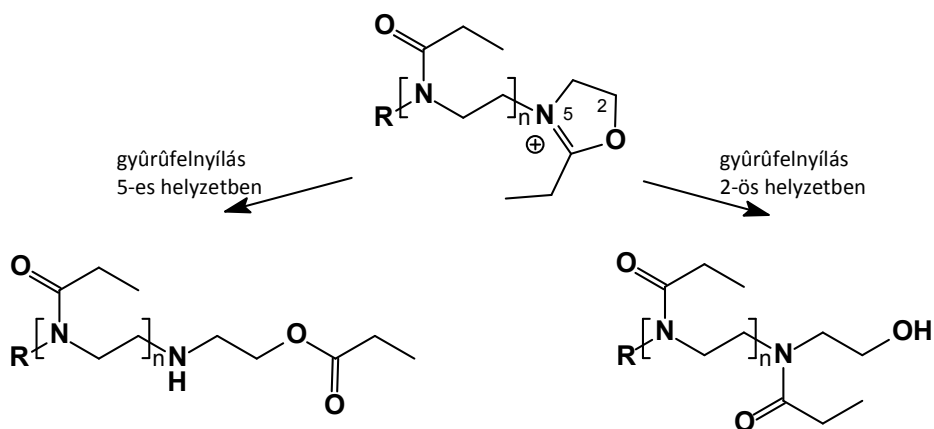
A 7 ismétlődő egységet tartalmazó **Me**-pEtOx prekursorionból $C_3H_6O_2$ eliminációjával képződő fragmension tömege 652,4 m/z. Felvettük ennek a fragmensionnak a pszeudo MS^3 spektrumát, amiben az **A**, **B** és **C** sorozatok is megjelennek. Ez azt jelenti, hogy a fragmensionnak tartalmaznia kell a polimer mindkét láncvégét, vagyis a $C_3H_6O_2$ kihasadása a láncközi ismétlődő egységekből történik lánchasadás nélkül. A fragmension feltételezett szerkezete és képződésének mechanizmusa a 35. ábra 2. sorában látható. A távozó csoport két egymás melletti oldalláncból hasad le propionsavként. A deuterált oldószerben végzett MS/MS fragmentációs mérések eredményei alátámasztják a feltételezéseket. A **Me**-pEtOx-ból képződő fragmension tömege (652,4 m/z) 1 m/z-vel tolódik el az MS/MS spektrumban, vagyis 1 disszociábilis hidrogént tartalmaz (hidroxil végcsoport deuterálódik), míg a **H**-pEtOx-ból képződő termékion tömege 2 m/z egységgel (mindkét végcsoportja tartalmaz 1-1 disszociábilis hidrogént, ami deutériumra cserélődik).



35. ábra

C₃H₄O és C₃H₆O₂ semleges molekulák lehasadásának mechanizmusa a prekursorionról.

Schubert és csoportja korábban tanulmányozta a polimer sorozat tagjainak nátrium ionnal képzett adduktjának fragmentációját.^{107,108,109} ESI-QTOF és MALDI-TOF körülmények között azt tapasztalták, hogy az egyes addukt ionok főként töltés távoli fragmentációval bomlanak, például hidrogén- és etilénvesztés jelent meg az MS/MS spektrumban. Ezzel ellentétben a protonált oligomerek bomlása az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között, a töltés által kiváltott fragmentációs mechanizmussal magyarázható. Az említett kutatócsoport azt is megállapította, hogy a pEtOx előállításakor használt élő kationos polimerizáció lánczáró lépése kétféle terméket is eredményezhet (36. ábra).¹⁰⁹ Azt találták, hogy a két termék összegképlete megegyezik. A mellékterméket az MS/MS spektrumból tudták azonosítani, ugyanis a kívánt termékhez képest megjelent egy propionsav veszteség a prekursorionból. Ahogyan az a 36. ábrán látható a melléktermék propionsav-észter végcsoportot tartalmaz.



36. ábra

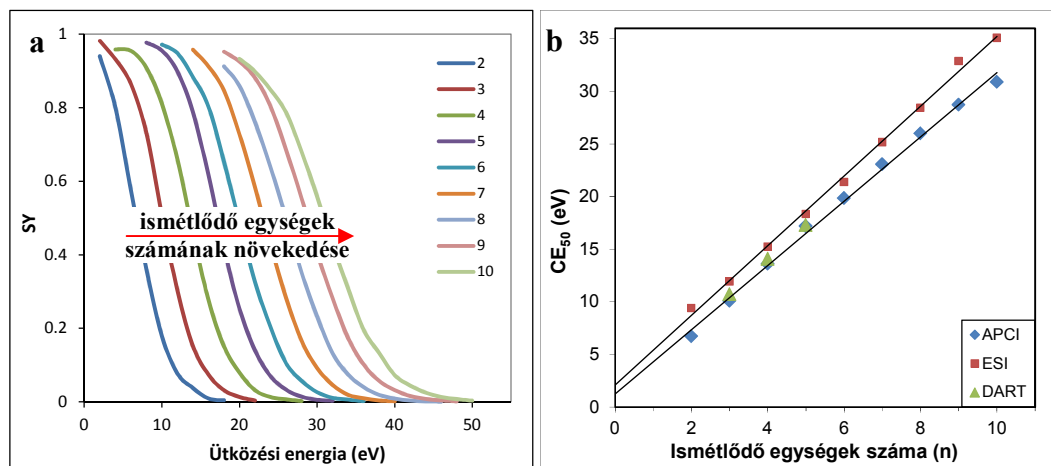
*A pEtOx előállításának lánczáró lépése.*¹⁰⁹

Ebből az irodalmi előzményből arra lehetne következtetni, hogy az általunk tapasztalt propionsav vesztes is az előbb említett polimerizációs melléktermék jelenlétére utal. Saját kísérleteink eredményei azonban ezt nem támasztják alá. Az LC-MS kromatogram a H és Me végcsoportú pEtOx polimerek jelenlétét erősíti meg, de a propionsav-észter végcsoportot tartalmazó sorozat jelenlétére nem utal. A 7 ismétlődő egységet tartalmazó **Me**-pEtOx prekursorionból propionsav veszteséssel képződő fragmension ($652,474\ m/z$ a 30. ábrán) további fragmentációját is megvizsgáltuk. A $652,474\ m/z$ fragmension pszeudo MS^3 spektrumában az A, B és C sorozatok is megjelennek, vagyis a polimer mindkét végcsoportját (H/Me és OH) tartalmaznia kell. Javaslataink szerint ezért a propionsav lehasadása az ismétlődő egységekből történik a 35. ábrán látható mechanizmussal.

5.3.4. A különböző lánc hosszúságú pEtOx oligomerek fragmentációjának energiafüggése

A pEtOx növekvő lánc hosszúságú (2-10 monomer egységet tartalmazó) oligomereinek fragmentációját vizsgáltuk az ütközési energia függvényében. Meghatároztuk az egyes prekursorionokhoz tartozó SY göbéket, amelyeket a 37.a ábrán mutatunk be. A 37.b ábra a CE_{50} és a pEtOx polimer lánc hosszúsága közötti összefüggést mutatja különböző ionforrással (APCI, ESI és DART) ionizált prekursorion esetén. A **H**-pEtOx polimerek fragmentációjának

energiafüggése a **Me-pEtOx** esetén tapasztaltakkal teljesen analóg, ezért az ábrákon csak a **Me-pEtOx**-ra vonatkozó adatok szerepelnek.



37. ábra

(a) A 2-10 monomeregységből álló pEtOx oligomerek SY-görbéje APCI ionforrás esetén. (b) Lineáris összefüggés az ismétlődő egységek száma és a CE₅₀ értékek között különböző ionforrások esetében. (APCI, ESI és DART).

A 37.b ábra alapján tehát megállapítható, hogy minél hosszabb a polimerlánc, annál nagyobb ütközési energia szükséges az azonos mértékű fragmentációhoz. Az ismétlődő egységek száma és a CE₅₀ értékek közötti összefüggés lineáris. Egyetértve Memboeuf és munkatársai értelmezésével a lineáris összefüggés a következőképpen értelmezhető:¹² Az ütközések során egy kötésre átadott belső energia értéke függ a szabadsági fokok számától, a prekursorion és az ütközési gáz tömegétől, valamint az ütközések számától.¹¹⁸ Egyetlen ütközés során a prekursorionnak átadott energia függ a tömegközépponti energiától és fordítottan arányos a prekursorion tömegével (mivel a prekursorion tömegéhez képest az ütközési gáz tömege elhanyagolható). A kvadrupól ütközési cellában, többszörös ütközések miatt az ütközések száma nő az ütközési hatáskeresztmetszettel, vagyis a molekula méretével. Feltételezve, hogy az ütközési hatáskeresztmetszet közel lineárisan változik a molekulamérettel, a következőkre jutottak. Polietilén-glikol, polipropilén-glikol és a politetrahidrofurán polimerekkel végzett ion-mobilitási kísérletekben¹¹⁹ azt tapasztalták, hogy a két hatás, a tömegközépponti energia csökkenése és az ütközési hatáskeresztmetszet növekedése (vagyis az ütközések számának

növekedése) kompenzálja egymást, így a CE_{50} értékek csak a szabadsági fokok számától függenek. Mivel az egy kötésre jutó belső energia fordítottan arányos a szabadsági fokok számával, a CE_{50} érték egyenesen arányos a szabadsági fokok számával. Egy homológ sorban, vagy például egy oligomer sorozatban a CE_{50} érték ennek megfelelően közel egyenesen arányos a molekulatömeggel, vagy az ismétlődő egységek számával.

A lineáris összefüggésnek köszönhetően könnyű megbecsülni, hogy a molekulatömegtől függően mekkora ütközési energiát kell alkalmaznunk a szükséges mértékű fragmentáció eléréséhez. A DART és APCI ionforrásokkal kapott eredmények jól egyeznek, ugyanis a két ionforrásban az ionok közel azonos kezdeti belső energiával képződnek. Az ESI körülmények között képződő ionok kezdeti belső energiája azonban alacsonyabb, ezért nagyobb ütközési energia szükséges az ugyanolyan mértékű fragmentáció eléréséhez.

6. ÖSSZEFOGLALÓ

Az ESI körülmények között képződő protonált buprenorfin származékok MS/MS vizsgálatát végeztük el Q-TOF tömegspektrométerrel. A fragmentáció a nitrogénen lévő szubsztituens lehasadásával kezdődik, amely a piperidin gyűrű egy részével együtt távozik az prekursorionról. Ezzel párhuzamosan a C(6) szénatomon lévő metoxi csoport is lehasad metanolként, valamint a C(7) szénatomon lévő csoport fragmentációja is elindul, kis molekulák kilépésével. Meghatároztuk az MS/MS spektrumban megjelenő fragmensionok letörési görbéit, amelyek az alkalmazott ütközési energia függvényében mutatják a termékion intenzitását. A disszociáció energiafüggésének vizsgálatakor megállapítottuk, hogy azon származékok, ahol a C(7) szénatomon acetyl csoport található nagyobb ütközési energiánál fragmentálódnak, mint azok a származékok, ahol a C(7) szénatomon $-C(CH_3)(tBu)OH$ vagy $-C(CH_3)(Pr)OH$ csoportok vannak. Mivel a nitrogénen és a C(7) szénatomon lévő szubsztituensek már kis ütközési energiánál lehasadnak, a további fragmentáció mind az öt vizsgált vegyület esetében egy közös termékionból vezethető tovább.

Az ütközési energia növelésével megindul a kondenzált gyűrűs alapváz fragmentációja és számos új fragmension jelenik meg. Javaslatot tettünk a legtöbb képződött termékion szerkezetére és a képződésükhöz vezető reakcióutakra. Javaslatunk összhangban vannak a pontos tömeg alapján meghatározott összegképlettel és a prekursorion szerkezetével. Pszeudo MS^3 mérésekkel igazoltuk az MS/MS eredményekből feltételezett fragmentációs útvonalakat. A buprenorfin fragmentációs viselkedését más morfinszármazékok fragmentációjával összehasonlítva megállapítottuk, hogy sok fragmension közös, a különbségeket a C(18)-C(19) etilén hídból eredő eltérő viselkedés eredményezi. Javaslatot tettünk azon termékionok képződésének mechanizmusára, amelyeknél ennek az etilén hídnak szerepe van.

Megvizsgáltuk a szilimarin komponensekből ESI körülmények között keletkezett, egyszerűen negatív töltésű deprotonált ionok fragmentációjának energiafüggését. Meghatároztuk a szilimarin komponensek fragmentációjának mértékét, a disszociálatlan hányad (SY) értékeket minden ütközési energiánál. Az SY értékeket az ütközési energia függvényében ábrázolva megkaptuk a SY görbét, amelyekből megállapítottuk, hogy a szilikrisztin A és B fragmentációja 5 eV-tal kisebb energiánál játszódik le, mint a többi komponens esetében. A görbék alapján meghatároztuk az egyes vegyületekhez tartozó CE_{50} értékeket, vagyis azt az ütközési energiát, ahol az prekursorion 50%-ban fragmentálódott.

A szilibin A és az izoszilibin A fragmentációs viselkedése a két vegyület nagyfokú szerkezeti hasonlósága ellenére eltér egymástól. A szilibin A-ból nagyobb intenzitással keletkezik a 301 m/z ion, az izoszilibin A-ból pedig a 453 m/z ion. A 451 m/z ion pedig csak a szilibin A MS/MS spektrumában van jelen, az izoszilibin A spektrumából teljesen hiányzik. A megfigyelt különbségeket a másodlagos konformerek eltérő stabilitásával magyaráztuk. A legstabilabb konformerben mindkét vegyület esetén a C és a D gyűrű csavartkád állású és a rajtuk lévő szubsztituensek ekvatoriális helyzetűek. A szilibin és az izoszilibin azon konformerei, ahol egyszerre mindkét gyűrűn lévő szubsztituensek axiális helyzetűek eltérő stabilitást mutatnak, ez okozhatja a fragmensionok intenzitásának eltérését.

A szintetizált poli-(2-etil-2-oxazolin) polimer karakterizálása után különböző lágyionizációs technikákkal (ESI, APCI, DART) tanulmányoztuk a fragmentációs viselkedését. Megmutattuk, hogy a szintézis során kétféle láncvégű polimer keletkezik a H-pEtOx (hidrogén és hidroxil végcsoportú) és a Me-pEtOx (metil és hidroxil végcsoportú polimer). Meghatároztuk a számátlag- valamint tömegátlag-molekulatömegeket és a polidiszperzitást méretkizárásos kromatográfiával és tömegspektrometriás módszerekkel. Összehasonlítva a kapott eredményeket megállapítottuk, hogy APCI-MS módszerrel meghatározott átlag molekulatömege a vártnál kisebb, mivel a nagyobb tömegű molekulák már a magas hőmérsékletű ionforrásban fragmentálódnak. Az egyszeres pozitív töltésű protonált oligomerek fragmentációját mindkét végcsoportú polimer esetén megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az egyes prekursorionok MS/MS spektrumában 3 sorozat van jelen. A mért pontos tömegek alapján megállapítottuk ezen sorozatok összegképletét. Pszeudo MS³ mérésekkel részletesen vizsgáltuk a fragmentációs útvonalakat, és mechanizmust javasoltunk a fragmension sorozatok képződésére. Deuterált oldószerben végzett MS/MS vizsgálatokkal sikeresen igazoltuk a javasolt szerkezeteket és fragmentációs utakat. A fragmentáció hatásfokát disszociálatlan hányad (SY) görbék segítségével jellemeztük. Meghatároztuk a különböző polimerizációs fokú polimerek fragmentációjára jellemző CE₅₀ ütközési energiákat. Megállapítottuk, hogy lineáris összefüggés van a monomer egységek száma és a CE₅₀ értékek között.

7. SUMMARY

The collision induced dissociation of the buprenorphine and four related compounds was studied with ESI-QTOF mass spectrometry. The generalized fragmentation scheme of the studied compounds starts with the elimination of the R_2 substituent from the piperidine nitrogen and the subsequent rupture of the piperidine ring. This process is parallel with the losses of small molecules from the R_1 substituent at C(7) and the methoxy substituent at C(6). Based on the energy-dependent CID experiments the R_1 = acetyl group shows higher stability towards dissociation, although no new routes of fragmentation were observed when R_1 is acetyl. In the last stage of fragmentation the core-ring structure is altered during the multistep rearrangement and cross-ring cleavage processes. The $-OR_3$ substituent at C(3) is eliminated only during these steps. The overall fragmentation pattern of buprenorphine (**5**) shows several similarities to that of the related morphinans, the main differences are due to the presence of the C(18)-C(19) ethylene bridge in buprenorphine. The energy-dependent fragmentation profile of a selected precursor or fragment could be easily visualized by the construction of two-dimensional plots from the recorded mass spectra.

The collision energy dependence of the fragmentation behavior of the major silymarin constituents was studied by electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. The survival yield (SY) plots of silydianin, the silybins and the isosilybins coincide with each other, while the SY plots of the silychristins are shifted to lower energies with about 5 eV. As the breakdown diagram analysis revealed it is advisable to record the MS/MS spectra of the components at adjusted laboratory frame collision energies to get the same SY value (e.g., 50%) in each case, as this technique ensures higher reproducibility, thus can be utilized for the rapid identification of the silymarin constituents. We also highlighted and explained that a simple substituent exchange can dramatically alter the fragmentation properties as in the case of silybin A and isosilybin A, where the distinct fragmentation behavior is due to a stability shift between the possible conformations. The results of the conformational analysis show that the double diaxial conformer of silybin A has significantly lower relative energy compared to the analogous conformer of isosilybin A.

The synthesized poly(2-ethyl-2-oxazoline) polymer was characterized by SEC, MALDI-TOF MS and Q-TOF MS equipped with ESI, APCI, DART ion sources. Two different polymer series appeared in the mass spectra because of chain transfer reactions during the polymerization (one with hydrogen and

hydroxyl end-groups, and the other with methyl and hydroxyl end-groups). The average molecular weights and polydispersity were compared after determination by SEC, MALDI-, APCI- and ESI-MS. The fragmentation behaviour of the protonated oligomers was studied in the quadrupole-time of flight mass spectrometer (Q-TOF MS) with electrospray (ESI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and direct analysis in real time (DART) soft ionization techniques. Three product ion series formed from the precursor ion were identified, and a mechanism was proposed for the dissociation, based on the accurate mass of the product ions, pseudo MS³ experiments and the energy-dependence of the product ion intensity. Two additional losses were observed in the MS spectra, the elimination of a side group and elimination of propionic acid within the chain. The results of the MS/MS experiments of the polymer dissolved in deuterated methanol confirmed the proposed mechanisms.

The survival yield method was used to describe the efficiency of the fragmentation quantitatively; and it was studied as a function of chain length of the pEtOx oligomer and the ionization method. Linear correlation was established between the number of the repeat units of the oligomers and the laboratory frame collision energy. This simple relationship enables the prediction of proper laboratory frame collision energy to obtain structural information for polymers.

8. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

1. Energy-dependent collision-induced dissociation study of buprenorphine and its synthetic precursors
B. Biri, J. Kalmár, L. Nagy, A. Sipos, M. Zsuga, S. Kéki
Rapid Communications in Mass Spectrometry **2011**; 25 (1): 41-49. **IF: 2,790**
2. Collision induced dissociation study of the major components of silymarin
Á. Kuki, B. Biri, L. Nagy, Gy. Deák, J. Kalmár, A. Mándi, M. Nagy, M. Zsuga, S. Kéki
International Journal of Mass Spectrometry **2012**; 315: 46. **IF: 2,549**
3. Collision-induced dissociation study of poly(2-ethyl-2-oxazoline) using survival yields and breakdown curves
B. Biri, L. Nagy, Á. Kuki, E.R. Tőke, Gy. Deák, M. Zsuga, S. Kéki
Journal of Mass Spectrometry **2013**; 48 (1): 16-23. **IF: 3,268**

Egyéb közlemények

1. Photodecomposition of o-phthaldialdehyde-derivatized amino acids by the photodiode array detector during their high-performance liquid chromatographic analysis
S. Kéki, J. Török, B. Biri, J. Zsuga, R. Gesztelyi, D. Bereczki, M. Zsuga
Journal of Chromatography A **2008**; 1185: 301. **IF: 3,756**
2. Increased production of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in ankylosing spondylitis: Association with other clinical and laboratory parameters
Á. Kemény-Beke, R. Gesztelyi, N. Bodnár, J. Zsuga, Gy. Kerekes, M. Zsuga, B. Biri, S. Kéki, P. Szodoray, A. Berta, Z. Szekanecz, S. Szántó
Joint Bone Spine **2011**; 78 (2): 184. **IF: 2,274**
3. Systematic identification of active ingredients of Silybum Marianum seed
L. Nagy, Á. Kuki, G. Deák, B. Biri, M. Nagy, M. Zsuga, S. Kéki
Jurnal Medical Aradean (Arad Medical Journal) **2011**; 14 (2): 9-12.
IF: -
4. Mechanism of Decomposition of the Human Defense Factor Hypothiocyanite Near Physiological pH
J. Kalmar, K. Woldegiorgis, B. Biri, M. Ashby
Journal of the American Chemical Society **2011**; 133 (49): 19911. **IF: 9,907**
5. Detailed Mechanism of the Autoxidation of N-hydroxyurea Catalyzed by an SOD mimic Mn(III) porphyrin: Formation of the Nitrosylated Mn(II) porphyrin as an Intermediate
J. Kalmár, B. Biri, G. Lente, I. Bányai, A. Budimir, M. Biruš, I. Batinić-Haberle, I. Fábián
Dalton Transaction **2012**; 41: 11875-11884. **IF: 3,838**
6. Identification and characterization of microbial biofilm communities associated with corroded oil pipeline surfaces
T. R. Lenhart, K. E. Duncan, I. B. Beech, J. A. Sunner, W. Smith, V. Bonifay, B. Biri, J. M. Suflita
Biofouling közlésre beküldve

Konferencia előadások és poszterek

1. Methylarginine metabolism is different in acute and chronic hypoxia:
12AP1 – 3
T. Molnár, B. Sütő, B. Biri, L. Nagy, S. Kéki, I. Ruzsics
European Journal of Anaesthesiology **2013**; 30: 181.
2. Szénhidrogének anaerob biodegradációja során képződő metabolitok LC/MS vizsgálata
B. Biri, D. Aktaz, J. Sunner, S. Kéki
XVII. International Conference on Chemistry, Nov. 3-6, 2011, Cluj-Napoca, Romania
3. A hipotociános-sav (HOSCN) vizes oldatbeli bomlása fiziológiához közeli pH-n
J. Kalmár, B. Biri, K. Lemma, M.T. Ashby
XVII. International Conference on Chemistry, Nov. 3-6, 2011, Cluj-Napoca, Romania
4. Egy nem azonosított Silymarin komponens elválasztása oszlopkromatográfiás módszerrel
Gy. Deák, B. Biri, Á. Kuki, L. Nagy, M. Zsuga, S. Kéki
XVII. International Conference on Chemistry, Nov. 3-6, 2011, Cluj-Napoca, Romania
5. Mass spectrometric approaches to the study of bacterial metabolomes aimed at diagnosis of anaerobic hydrocarbon degradation and associated biocorrosion (poster)
J. Sunner, B. Biri, S. Foster, I. Beech, M. Kowalski, J. Suflita, D. Aktas, I. Davidova
59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 5-9, 2011, Denver, Colorado, USA

6. A hipotiocianos-sav (HOSCN) vizes oldatbeli bomlásának mechanizmusa fiziológiához közeli pH-n
Kalmár J., Biri B., K. L. Woldegiorgis, M. T. Ashby
MTA Reakciókinetikai és Fotokémiai Munkabizottság ülése, 2011. okt. 27-28., Gyöngyöstarján.
7. Zsírsv szarmazékok mennyiségi meghatározása
Biri B., Oláh A., Sós K., Zsuga M., Kéki S.
MTA Tudomány Napja, Doktoranduszok Fóruma, Debrecen, 2010. nov. 4.
8. Tandem tömegspektrometria szerepe: Szilimarín komponensének APCI-MS/MS fragmentációs vizsgálata
B. Biri, L. Nagy, Á. Kuki, M. Zsuga, S. Kéki
International Conference „Natural and artificial ecosystems in the Somes-Cris- Mures- Tisa river basin” May 7-8, 2010, Macea, Romania
9. Vércsérum aminosav tartalmának meghatározása
B. Biri, J. Zsuga, R. Gesztelyi, D. Bereczki, M. Zsuga, S. Kéki
XV. International Conference on Chemistry, Nov. 12-15, 2009, Tirgu Mures, Romania
10. Anandamid és 2-Arachidonóil-glicerín meghatározása APCI-MS módszerrel
B. Biri, S. Kéki
MTA Műanyag és Természeti Polimerek Munkabizottság: munkabizottsági ülés, 2009 ápr. 23., Budapest
11. Anandamid és 2-Arachidonóil-glicerín kvantitatív meghatározása sejtkultúrákból
B. Biri, Á. Kuki, L. Nagy, S. Kéki, M. Zsuga, L. Ambrus, E. Lisztes
XIV. International Conference on Chemistry, Nov. 13-15, 2008, Cluj-Napoca, Romania

9. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- ¹ E. de Hoffmann, V. Stroobant. Mass Spectrometry: Principles and Applications. John Wiley & Sons, **2007**
- ² S. Kim, R. P. Rodgers, A. G. Marshall Trula exact mass: Elemental composition can be determined uniquely from molecular mass measurement at ~ 0.1 mDa accuracy for molecules up to ~ 500 Da. *International Journal of Mass Spectrometry* **2006**; 251 (2): 260-265.
- ³ M. Karas, R. Krüger. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chemical Reviews* **2003**; 103 (2): 427-440.
- ⁴ J. B. Fenn, M. Mann, Ch. K. Meng, Sh. F. Wong, C. M. Whitehouse, Electrospray ionization—principles and practice. *Mass Spectrom. Rev.* **1990**; 9: 37.
- ⁵ N. Felitsyn, M. Peschke, P. Kebarle. Origin and number of charges observed on multiply-protonated native proteins produced by ESI. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**; 219 (1): 39-62.
- ⁶ A. Espada, A. Rivera-Sagredo. Ammonium hydrogencarbonate, an excellent buffer for the analysis of basic drugs by liquid chromatography–mass spectrometry at high pH. *Journal of Chromatography A* **2003**; 987 (1): 211-220.
- ⁷ R.B. Cody, J.A. Laramée, H.D. Durst. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Anal. Chem.* **2005**; 77 (8): 2297–2302.
- ⁸ S. A. Goudsmit, A Time-of-Flight Mass Spectrometer *Physical Review* **1948**; 74: 622-623.
- ⁹ B. A. Mamyrin, D. V. Schmikk, V. A. Zagulin. *Soviet Phys. JEPT.* **1973**; 37: 45
- ¹⁰ F. Derwa, E. D. Pauw, P. Natalis, New basis for a method for the estimation of secondary ion internal energy-distribution in soft ionization techniques, *Org. Mass Spectrom.* **1991**; 26: 117.
- ¹¹ X. H. Guo, M. C. Duursma, P. G. Kistemaker, N. M. M. Nibbering, K. Vekey, L. Drahos, R. M. Heeren, Manipulating internal energy of protonated biomolecules in electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* **2003**; 38: 597
- ¹² A. Memboeuf, A. Nasioudis, S. Indelicato, F. Pollreis, Á. Kuki, S. Kéki, OF van den Brink, K. Vékey, L. Drahos, Size effect on fragmentation in tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* **2010**; 82: 2294.

- ¹³ Á. Kuki, L. Nagy, A. Memboeuf, L. Drahos, K. Vékey, M. Zsuga, S. Kéki. Energy-Dependent Collision-Induced Dissociation of Lithiated Polytetrahydrofuran: Effect of the Size on the Fragmentation Properties. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**; 21: 1753.
- ¹⁴ D. Doyle, G. Hanks, I. Cherney et al., eds. Oxford Textbook of Palliative Medicine (3rd ed.). Oxford University Press. **2004**
- ¹⁵ K. W. Bentley, D. G. Hardy. Novel Analgesics and Molecular Rearrangements in the Morphine-Thebaine group. I. Ketones Derived from 6,14-endo-Ethenotetrahydrothebaine. *Journal of the American Chemical Society* **1967**; 89 (13): 3267–3273.
- ¹⁶ K. W. Bentley, D. G. Hardy, B. Meek. Novel Analgesics and Molecular Rearrangements in the Morphine-Thebaine Group. II. Alcohols Derived from 6,14-endo-Etheno- and 6,14-endo-Ethanotetrahydrothebaine. *Journal of the American Chemical Society* **1967**; 89 (13): 3273–3280.
- ¹⁷ K. W. Bentley, D. G. Hardy. Novel Analgesics and Molecular Rearrangements in the Morphine-Thebaine Group. III. Alcohols of the 6,14-endo-ethenotetrahydrothebaine Series and Derived Analogs of N-Allylnormorphine and -norcodeine. *Journal of the American Chemical Society* **1967**; 89 (13): 3281–3292.
- ¹⁸ K. W. Bentley, D. G. Hardy, B. Meek. Novel Analgesics and Molecular Rearrangements in the Morphine-Thebaine Group. IV. Acid-Catalyzed Rearrangements of Alcohols of the 6,14-endo-Ethenotetrahydrothebaine Series. *Journal of the American Chemical Society* **1967**; 89 (13): 3293–3303.
- ¹⁹ K. W. Bentley, D. G. Hardy. Discovery of etorphine. New potent analgesics in the morphine series. *Proc. Chem. Soc.* **1963**; 220.
- ²⁰ G. F. Blane, A. L. A. Boura, A. E. Fitzgerald, R. E. Lister. Actions of etorphine hydrochloride (M99). A potent morphine like agent. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1967**; 30: 11-22.
- ²¹ A. F. Casy, R. T. Parfitt, Opioid Analgesics, Chemistry and Receptors, Plenum Press (New York), **1986**
- ²² J. W. Lewis, S. M. Husbands. The orvinols and related opioids-high affinity ligands with diverse efficacy profiles. *Current Pharmaceutical Design.* **2004**; 10(7): 717-732.
- ²³ K. W. Bentley, A. L. Boura, A. E. Fitzgerald, D. G. Hardy, A. McCoubrey, M. L. Aikman, R. E. Lister. Compounds Possessing Morphine-Antagonising or Powerful Analgesic Properties. *Nature* **1965**; 206 (4979): 102–103.

- ²⁴ A. Cowan, J.W. Lewis. Buprenorphine Combatting Drug Abuse with A Unique Opioid. Wiley-Liss (New York), **1995**
- ²⁵ J. W. Lewis. Buprenorphine *Drug and Alcohol Dependence* **1985**, 14: 363-372.
- ²⁶ J. Pergolizzi, A. M. Aloisi, A. Dahan, J. Filitz, R. Langford, R. Likar, S. Mercadante, B. Morlion, R. B. Raffa, R. Sabatowski, P. Sacerdote, L. M. Torres, A. A. Weinbroum. Current Knowledge of Buprenorphine and Its Unique Pharmacological Profile. *Pain Practice* **2010**; 10 (5): 428–450.
- ²⁷ F. Vocci, W. Ling. Medications development: Successes and challenges *Pharmacol. Ther.* **2005**; 108: 94-108.
- ²⁸ P. Compton, W. Ling, D. Moody, N. Chiang. Pharmacokinetics, bioavailability and opioid effects of liquid versus tablet buprenorphine *Drug Alcohol Depend.* **2006**; 82: 25-31.
- ²⁹ A. Tracqui, P. Kintz, P. Mangin. HPLC/MS determination of buprenorphine and norbuprenorphine in biological fluids and hair samples. *J. Forensic Sci.* **1997**; 42: 111-114.
- ³⁰ Y. S. Wang, D. L. Lin, S. C. Yang, M. Y. Wu, R. H. Liu, L. W. Su, P. S. Cheng, C. Liu, M. R. Fuh. Issues pertaining to the analysis of buprenorphine and its metabolites by gas chromatography–mass spectrometry *J. Chromatogr. A.* **2010**; 1217: 1688-1694.
- ³¹ D. E. Moody, M. H. Slawson, E. C. Strain, J. D. Laycock, A. C. Spanbauer, R. L. Foltz. A liquid chromatographic-electrospray ionization-tandem mass spectrometric method for determination of buprenorphine, its metabolite, norbuprenorphine, and a coformulant, naloxone, that is suitable for in vivo and in vitro metabolism studies. *Anal. Biochem.* **2002**; 306: 31-39.
- ³² C. M. Murphy, M. A. Huestis. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis for the quantification of buprenorphine, norbuprenorphine, buprenorphine-3- β -D-glucuronide and norbuprenorphine-3- β -D-glucuronide in human plasma *J. Mass Spectrom.* **2005**; 40: 70-74.
- ³³ D. Favretto, G. Frison, S. Vogliardi, S. D. Ferrara. Potentials of ion trap collisional spectrometry for liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry determination of buprenorphine and *nor*-buprenorphine in urine, blood and hair samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**; 20: 1257-1265.

- ³⁴ F. Musshoff, J. Trafkowski, U. Kuepper, B. Madea. An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites. *J. Mass Spectrom.* **2006**; 41: 633-640.
- ³⁵ M. Gergov, I. Ojanpera, E. Vuori. Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. *J. Chromatogr. B. Analyt Technol Biomed Life Sci* **2003**; 795: 41-53.
- ³⁶ S. Hegstad, H. Z. Khiabani, L. Kristoffersen, N. Kunoe, P. P. Lobmaier, A. S. Christophersen. Drug screening of hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry *J. Anal. Toxicol.* **2008**; 32: 364-372.
- ³⁷ M. K. Bjørk, M. K. K. Nielsen, L. Ø. Markussen, H. B. Klinker, K. Linnet. Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**; 396: 2393-2401.
- ³⁸ J. M. Hough, C. A. Haney, R. D. Voyksner, R. D. Bereman. Evaluation of Electrospray Transport CID for the Generation of Searchable Libraries *Anal. Chem.* **2000**; 72: 2265-2270.
- ³⁹ A. G. A. M. Lips, W. Lameijer, R. H. Fokkens, N. M. M. Nibbering. Methodology for the development of a drug library based upon collision-induced fragmentation for the identification of toxicologically relevant drugs in plasma samples *J. Chromatogr. B.* **2001**; 759: 191-207.
- ⁴⁰ A. M. Gioacchini, Z. Czarnocki, Z. Arazny, I. Munari, P. Traldi. Electrospray ionization, accurate mass measurements and multistage mass spectrometry experiments in the characterization of stereoisomeric isoquinoline alkaloids *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**; 14: 1592-1599.
- ⁴¹ C. Stévigny, J. L. Habib Jiwan, R. Rozenberg, E. de Hoffmann, J. Quetin- Leclercq. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**; 18: 523-528.
- ⁴² D. D. Fetterolf, R. A. Yost. Energy-resolved collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry *Int. J. Mass Spectrom. Ion Physics.* **1982**; 44: 37-50.
- ⁴³ C. P. G. Butcher, P. J. Dyson, B. F. G. Johnson, P. R. R. Langridge-Smith, J. S. McIndoe, C. Whyte. On the use of breakdown graphs combined with energy-dependent mass spectrometry to provide a complete picture of fragmentation processes *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**; 16: 1595-1598.

- ⁴⁴ D. M. S. Wheeler, T. H. Kinstle, Jr. K. L. Rinehart. Mass spectral studies of alkaloids related to morphine *J. Am. Chem. Soc.* **1967**; 89: 4494-4501.
- ⁴⁵ K. Raith, R. Neubert, C. Poeaknapo, C. Boettcher, M. H. Zenk, J. Schmidt. Electrospray tandem mass spectrometric investigations of morphinans *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**; 14: 1262-1269.
- ⁴⁶ Z. Zhang, B. Yan, K. Liu, T. Bo, Y. Liao, H. Liu. Fragmentation pathways of heroin-related alkaloids revealed by ion trap and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**; 22: 2851-2862.
- ⁴⁷ C. Poeaknapo, U. Fisinger, M. H. Zenk, Schmidt. Evaluation of the mass spectrometric fragmentation of codeine and morphine after ¹³C-isotope biosynthetic labeling *J. Phytochem.* **2004**; 65: 1413-1420.
- ⁴⁸ J. R. Wickens, R. Sleeman, B. J. Keely. Atmospheric pressure ionisation mass spectrometric fragmentation pathways of noscapine and papaverine revealed by multistage mass spectrometry and in-source deuterium labelling *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**; 20: 473-480.
- ⁴⁹ W. A. Smith, D. R. Lauren, E. J. Burgess, N. B. Perry, R. J. Martin, A silychristin isomer and variation of flavonolignan levels in milk thistle (*Silybum marianum*) fruits, *Planta Med.* **2005**; 71: 877.
- ⁵⁰ D. Y. W. Lee, Y. Liu, Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, and isosilybin B, isolated from *Silybum marianum* (milk thistle), *J. Nat. Prod.* **2003**; 66: 1171.
- ⁵¹ N. C. Kim, T. N. Graf, C.M. Sparacino, M.C. Wani, E.W. Wall, Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*), *Org. Biomol. Chem.* **2003**; 1: 1684.
- ⁵² D. Y. W. Lee, Y. Liu, in: F.Shahidi, C.T. Ho (Eds.), Phenolics in Foods and Natural Health Products, *ACS Symposium Series*, **2005**; 909: 19.
- ⁵³ P. Kidd, K. Head, A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos®), *Altern. Med. Rev.* **2005**; 10: 193.
- ⁵⁴ P. Ferenci, B. Dragosics, H. Dittrich, H. Frank, L. Benda, H. Lochs, S. Meryn, W. Base, B. Schneider, Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver *Journal of Hepatology* **1989**; 9 (1): 105–113.

- ⁵⁵ A. Valenzuela, A. Garrido, Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biological Research* **1994**; 27 (2): 105-112.
- ⁵⁶ R. Saller, R. Meier, R. Brignoli. The Use of Silymarin in the Treatment of Liver Diseases *Drugs* **2001**; 61 (14): 2035-2063.
- ⁵⁷ K. Wellington, B. Jarvis. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs* **2001**; 15 (7): 465-489.
- ⁵⁸ V. Křen, D. Walterová Silybin and Silymarin – new effects and Applications. *Biomed. Papers* **2005**; 149 (1): 29-41.
- ⁵⁹ M. Blumenthal, W. Busse. The complete german commission E monographs: Therapeutic guide to herbal medicines. American botanical council and integrative communications, Austin, TX **1998**; pp. 685-698.
- ⁶⁰ F. Fraschini, G. Dermartini, D. Esposti. Pharmacology of silymarin. *Clin. Drug Invest* **2002**; 22: 51–65.
- ⁶¹ R. Saller, R. Meier, R. Brignoli. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* **2001**; 61: 2035–2063.
- ⁶² L. Mollison, L. Totten, J. Flexman, M. Beaman, R. Batey, Randomized double blind placebo-controlled trial of a Chinese herbal therapy (CH100) in chronic hepatitis C, *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2006**; 21: 1184.
- ⁶³ K. E. Mayer, R. P. Myers, S. S. Lee, Silymarin treatment of viral hepatitis: a systematic review, *J. Viral Hepat.* **2005**; 12: 559.
- ⁶⁴ E. J. Ladas, K. M. Kelly. Milk thistle: is there a role for its use as an adjunct therapy in patients with cancer? *The Journal of Alternative & Complementary Medicine* **2003**; 9 (3): 411-416.
- ⁶⁵ K. Ramasamy, R. Agarwal. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer letters* **2008**; 269 (2): 352-362.
- ⁶⁶ R. Gazak, D. Walterova, V. Kren. Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Current medicinal chemistry* **2007**; 14 (3): 315-338.
- ⁶⁷ H. F. Huseini et al. The efficacy of Silybum marianum (L.) Gaertn.(silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double - blind, placebo - controlled, clinical trial. *Phytotherapy research* **2006**; 20 (12): 1036-1039.

- ⁶⁸ D. J. Kroll, H. S. Shaw, N. H. Oberlies. Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies. *Integr Cancer Ther* **2007**; 6:110–119.
- ⁶⁹ H. Wagner, L. Horhammer, R. Munster, On the chemistry of silymarin (silybin), the active principle of the fruits from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.). *Arzneimittelforschung*. **1968**; 18: 688-696.
- ⁷⁰ H. Wagner, P. Diesel, M. Seitz, The chemistry and analysis of silymarin from *Silybum marianum* Gaertn. *Arzneimittelforschung*. **1974**; 24: 466-471.
- ⁷¹ N. C. Kim, T. N. Graf, C. M. Sparacino, M. C. Wani, M. E. Wall. Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). *Org Biomol Chem*. **2003**; 1: 1684-1689.
- ⁷² F. Kvasnicka, B. Biba, R. Sevcik, M. Voldrich, J. Kratka, Analysis of the active components of silymarin, *J. Chromatogr. A* **2003**; 990: 239.
- ⁷³ J. I. Lee, B. H. Hsu, D. Wu, J. S. Barrett, Separation and characterization of silybin, isosilybin, silydianin and silychristin in milk thistle extract by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **2006**; 1116: 57.
- ⁷⁴ K. Wang, H. Zhang, L. Shen, Q. Du, J. Li, Rapid separation and characterization of active flavanolignans of *Silybum marianum* by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**; 53: 1053.
- ⁷⁵ N. A. Khan, H. Wu, Analysis of silymarin extracted from a commercial dosage by combining liquid-liquid extraction with negative electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**; 18: 2960.
- ⁷⁶ T. M. Ding, S. J. Tian, Z. X. Zhang, D. Z. Gu, Y. F. Chen, Y. H. Shi, Z. P. Sun, Validated optimized method for simultaneous analysis of active silymarin components and dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate in a pharmaceutical preparation by use of a monolithic silica C18 column, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**; 26: 155.
- ⁷⁷ M. Shibano, A. S. Lin, H. Itokawa, K. H. Lee, Separation and characterization of active flavanolignans of *Silybum marianum* by liquid chromatography connected with hybrid ion-trap and time-of-flight mass spectrometry (LC-MS/IT-TOF), *J. Nat. Prod.* **2007**; 70: 1424.
- ⁷⁸ S. Kéki, K. Tóth, M. Zsuga, R. Ferenczi, S. Antus, (+)-Silybin, a pharmacologically active constituent of *Silybum marianum*: fragmentation studies by atmospheric pressure

chemical ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**; 21: 2255.

⁷⁹ Á. Kuki, L. Nagy, Gy. Deák, M. Nagy, M. Zsuga, S. Kéki, An improved high performance liquid chromatographic-mass spectrometric method for the detection of silymarin constituents, *Chromatographia* **2012**; 75: 175.

⁸⁰ H.G. Schild. Poly(*N*-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog. Polym. Sci.* **1992**; 17: 163.

⁸¹ A. Mero, G. Pasut, L.D. Via, M.W.M. Fijten, U.S. Schubert, R. Hoogenboom, F.M. Veronese. Synthesis and characterization of poly(2-ethyl 2-oxazoline)-conjugates with proteins and drugs: Suitable alternatives to PEG-conjugates. *Journal of Controlled Release* **2008**, 125, 87.

⁸² C. Weber, R. Hoogenboom, U. S. Schubert. Temperature responsive bio-compatible polymers based on poly(ethylene oxide) and poly(2-oxazoline)s. *Progress in Polymer Science*, **2012**, 37, 686.

⁸³ C. J. Waschinski, V. Herdes, F. Schueler, J. C. Tiller. Influence of Satellite Groups on Telechelic Antimicrobial Functions of Polyoxazolines. *Macromol. Biosci.* **2004**; 5: 149.

⁸⁴ N. Adams, U.S. Schubert. Poly(2-oxazolines) in biological and biomedical application contexts. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2007**; 59: 1504.

⁸⁵ A. M. Ansari, P. V. Scaria, M. C. Woodle. Polymers for delivering peptides and small molecules in vivo. WO 2003-US2710, **2003**

⁸⁶ P. Alexandridis, B. Lindman. Amphiphilic Block Copolymers: Self-Assembly and Applications. Elsevier, New York, **2000**

⁸⁷ G. Pasut, F. M. Veronese. Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies. *Prog. Polym. Sci.* **2007**; 32: 933.

⁸⁸ R. Luxenhofer, Y. Han, A. Schulz, J. Tong, Z. He, A. V. Kabanov, R. Jordan. Poly (2-oxazoline) s as Polymer Therapeutics. *Macromolecular rapid communications*, **2012**; 33 (19): 1613-1631.

⁸⁹ *Macromolecular Rapid Communications* Special Issue: Poly(2-oxazoline)s and Related Pseudo-Polypeptides **2012**; 33 (19): 1593–1719. Issue edited by: Helmut Schlaad, Richard Hoogenboom

- ⁹⁰ C. Tros de Ilarduyaa, Y. Sunb, N. Düzgüne. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**; 40: 159–170.
- ⁹¹ E. R. Tőke, O. Lőrincz, E.Somogyi, J. Lisziewicz. Rational development of a stable liquid formulation for nanomedicine products. *I. J. Pharm.*, **2010**; 392: 261.
- ⁹² M. C. Woodle, C. M. Engbers, S. Zalipsky. New amphiphatic polymer-lipid conjugates forming longcirculating reticuloendothelial system-evading liposomes. *Bioconjugate Chemistry* **1994**; 5: 493.
- ⁹³ S. Zalipsky, C. B. Hansen, J. M. Oaks, T. M. Allen. Evaluation of blood clearance rates and biodistribution of poly(2-oxazoline)-grafted liposomes. *J. Pharm. Sci.* **1996**; 85: 133.
- ⁹⁴ S. M. Moghimi, J. Szebeni. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* **2003**; 42: 463.
- ⁹⁵ G. V. N. Rathna. Gelatin hydrogels: enhanced biocompatibility, drug release and cell viability. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**; 19: 2351.
- ⁹⁶ X. Wang, X. Li, Y. Li, Y. Zhou, C. Fan, W. Li, S. Ma, Y. Fan, Y. Huang, N. Li, Y. Liu. Synthesis, characterization and biocompatibility of poly(2-ethyl-2-oxazoline)–poly(d,l-lactide)–poly(2-ethyl-2-oxazoline) hydrogels. *Acta Biomaterialia* **2011**; 7: 4149.
- ⁹⁷ D. Christova, R. Velichkova, W. Loos, E. J. Goethals, F.D. Prez. New thermo-responsive polymer materials based on poly(2-ethyl-2-oxazoline) segments. *Polymer* **2003**; 44: 2255.
- ⁹⁸ F. C. Gaertner, R. Luxenhofer, B. Blechert, R. Jordan, M. Essler. Synthesis, biodistribution and excretion of radiolabeled poly(2-alkyl-2-oxazoline)s. *J. Controlled Release* **2007**; 119: 291.
- ⁹⁹ M. H. Litt, B. R. Hsieh, I. M. Krieger, T. T. T. T.Chen, H. L. Lu. Low surface energy polymers and surface-active block polymers : II. Rigid microporous foams by emulsion polymerisation. *J. Colloid Interface Sci.* **1986**; 115: 312.
- ¹⁰⁰ M. H. Litt, C. S. Lin. Selective hydrolysis of oxazoline block copolymers. *J. Polym. Sci., Part A: Polym Chem.* **1992**; 30: 779.
- ¹⁰¹ O. Nuyken, R. Weberskirch, T. Kotre, D. Schoenfelder, A. Woerndle. Polymers for micellar catalysis. *Polym. Mater. Org. Synth. Catal.* **2003**; 277.
- ¹⁰² R. Jordan, A. Foertig, O. Purruicker, M. Tanaka, R. Gleixner. Tailored polymers for the construction of biomimetic cell membranes. *Polym Prepr.* **2006**; 47: 197.

- ¹⁰³ H.-J. Choi, E. Brooks, C.D. Montemagno. Synthesis and characterization of nanoscale biomimetic polymer vesicles and polymer membranes for bioelectronic applications. *Nanotechnology* **2005**; 16: S143.
- ¹⁰⁴ R. Hoogenboom: Poly(2-oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**; 48: 7978.
- ¹⁰⁵ M. W. Nielen. MALDI time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers. *Mass Spectrometry Reviews*, **1999**; 18(5), 309-344.
- ¹⁰⁶ G. Montaudo, R. P. Lattimer, eds. *Mass spectrometry of polymers*. CRC Press, **2010**.
- ¹⁰⁷ A. Baumgaertel, C. Weber, K. Knop, A. Crecelius, U.S. Schubert. Characterization of different poly(2-ethyl-2-oxazoline)s via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**; 23: 756.
- ¹⁰⁸ E. Altuntas, K. Kempe, A. Crecelius, R. Hoogenboom, U. S. Schubert. ESI-MS & MS/MS Analysis of Poly(2-oxazoline)s with Different Side Groups. *Macromol. Chem. Phys.* **2010**; 211: 2312.
- ¹⁰⁹ A. Baumgaertel, E. Altuntas, K. Kempe, A. Crecelius, U.S. Schubert. Characterization of Different Poly(2-oxazoline) Block Copolymers by MALDI-TOF MS/MS and ESI-Q-TOF MS/MS. *J. Polym. Sci., Part A: Polym Chem.* **2010**; 48: 5533.
- ¹¹⁰ Berényi S, Hosztafi S, Makleit S, Simon Cs, Marton J. *Hungary Patent HU 210158*, issued 28/05/ 1994
- ¹¹¹ A. Kahol, K. Singh, S. Tandon, S. Kumar, Process for isolation of hepatoprotective agent silymarin from the seeds of the plant *Silybum marianum*, *Indian Patent* 06309678, **2001**
- ¹¹² R. D. Hiserodt, B. M. Pope, M. Cossette, M. L. Dewis. Proposed mechanisms for the fragmentation of doubly allylic alkenamides (tingle compounds) by low energy collisional activation in a triple quadrupole mass spectrometer *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**; 15: 1462-1470.
- ¹¹³ M. W. Wensing, A. P. Snyder, C. S. Harden. Energy Resolved Mass Spectrometry of Dialkyl Methylphosphonates with an Atmospheric Pressure Ionization Tandem Mass Spectrometer *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**; 10: 1259-1265.
- ¹¹⁴ Schrodinger, LLC. Products–MacroModel. Available online: <http://www.schrodinger.com/Products/macromodel.html> (accessed on 13 January **2012**).

- ¹¹⁵ M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian 09, Revision B.01, **2010**, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- ¹¹⁶ U. Varetto, MOLEKEL 5.4., **2009**, Swiss National Supercomputing Centre: Manno, Switzerland.
- ¹¹⁷ B. Desmazières, W. Buchmann, P. Terrier, J. Tortajada. APCI Interface for LC- and SEC-MS Analysis of Synthetic Polymers: Advantages and Limits *Anal. Chem.* **2008**; 80: 783.
- ¹¹⁸ K. Vékey. Internal Energy Effects in Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom.* **1996**; 31: 445.
- ¹¹⁹ J. Gidden, T. Wytenbach, A. T. Jackson, J. H. Scrivens, M. T. Bowers. Gas-phase conformations of synthetic polymers: Poly(ethylene glycol), poly(propylene glycol), and poly(tetramethylene glycol). *J. Am. Chem. Soc.* **2000**; 122: 4692.